

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05646

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C12N15/12, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, C07K14/47, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395, G01N33/53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C12N15/12, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, C07K14/47, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST File (JOIS), GenBank/DBJ/EMBL/Geneseq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX PA	Takahiro, N. et al., "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. IX. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Can Code for Large Proteins in vitro" DNA Res. (1998, Apl.) Vol. 5, No. 1 p.31-39	1-7, 9-12, 14, 16-17 8, 13, 15, 18-19
X A	Tadahiro, K. et al., "Molecular Cloning of p125 <sup>Nap1</sup> , a Protein That Associates with an SH3 Domain of Nck" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1996) Vol. 219, No. 2 p.509-514	1-7, 9-12, 14, 16-17 8, 13, 15, 18-19
X A	Yukari, K. et al., "Interaction of Nck-associated protein 1 with activated GTP-binding protein Rac" Biochem. J. (1997, May) Vol. 322, No. 3 p.873-878	1, 16-17 2-15, 18-19
A	Stefan, B. et al., "The HEM Proteins: A Novel Family of Tissue-specific Transmembrane Proteins Expressed from Invertebrates through Mammals with an Essential Function in Oogenesis" J.Mol. Biol. (1995) Vol. 251, No. 1 p.41-49	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 March, 1999 (05. 03. 99)		Date of mailing of the international search report 16 March, 1999 (16. 03. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/05646

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N15/12, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, C07K14/47, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395, G01N33/53

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N15/12, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, C07K14/47, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST7744 (JOLIS), GenBank/DBJ/EMBL/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX PA	Takahiro, N. et al. "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. IX. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Can Code for Large Proteins <i>in vitro</i> " DNA Res. (1998, Apl.) 第5巻 第1号 p. 31-39	1-7, 9-12, 14, 16-17 8, 13, 15, 18-19
X A	Tadahiro, K. et al. "Molecular Cloning of p125 <sup>Nck</sup> , a Protein That Associates with an SH3 Domain of Nck" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1996) 第219巻 第2号 p. 509-514	1-7, 9-12, 14, 16-17 8, 13, 15, 18-19
X A	Yukari, K. et al. "Interaction of Nck-associated protein 1 with activated GTP-binding protein Rac" Biochem. J. (1997, May) 第322巻 第3号 p. 873-878	1, 16-17 2-15, 18-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.03.99

国際調査報告の発送日

16.03.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関二丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富士 良宏

印

4 B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 24 June 1999 (24.06.99)	
International application No.: PCT/JP98/05646	Applicant's or agent's file reference: PH-603-PCT
International filing date: 14 December 1998 (14.12.98)	Priority date: 15 December 1997 (15.12.97)
Applicant: SAKAKI, Yoshiyuki	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
14 January 1999 (14.01.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer:

J. Zahra

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 26 NOV 1999

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PH-603-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/05646	国際出願日 (日.月.年) 14.12.98	優先日 (日.月.年) 15.12.97
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>8</sup> C12N15/12, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, C07K14/47, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395, G01N33/53		
出願人 (氏名又は名称) 協和醗酵工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で            ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 14.01.99	国際予備審査報告を作成した日 15.11.99	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9549

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-19	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-19	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-19	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲 1-19

請求の範囲 1-19に係る発明は、国際調査報告で提示された何れの文献にも記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。

(文献1: Biochem. Biophys. Res. Commun. 219 [2] (1996) p. 509-514

文献2: Biochem. J. 322 [3] (1997) p. 873-878

には、共にラット由来のNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase蛋白質が記載されているが、アポトーシス抑制活性があるかどうかは何ら具体的に記載されていない。)

## Ⅶ. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付けについての意見を次に示す。

請求の範囲 9 記載のオリゴヌクレオチドは、ヒト N a p I 蛋白質をコードする D N A から連続する 5 ～ 6 0 残基の塩基配列を任意に取り出したオリゴヌクレオチド断片である。しかしながら、明細書にはこのような断片が具体的にどのような性質を有し、どのような用途に使用できるのか明確に記載されていないから、請求の範囲 9 に係る発明について、明細書に十分な裏付けがあるとは認められない。なお、請求の範囲 1 2 - 1 5 についても同様である。

請求の範囲 1 9 には、ヒト N a p I 蛋白質を認識する抗体を有効成分とする、アポトーシスが関与する疾患に対する治療薬が記載されているが、明細書で確認されているのは、配列番号 2 6、2 8 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、アポトーシスを抑制できたことが記載されているのみで、ヒト N a p I 蛋白質を認識する抗体自体は作製されていないし、このような抗体がアポトーシス関連疾患に医薬組成物として機能することも何ら具体的に記載されていない。したがって、請求の範囲 1 9 に係る発明について、明細書に十分な裏付けがあるとは認められない。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP98/05646

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl.<sup>6</sup> C12N15/12, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, C07K14/47, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>6</sup> C12N15/12, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, C07K14/47, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST File (JOIS),  
GenBank/DDBJ/EMBL/Geneseq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX PA	Takahiro, N. et al., "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. IX. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Can Code for Large Proteins in vitro" DNA Res. (1998, Apl.) Vol. 5, No. 1 p.31-39	1-7, 9-12, 14, 16-17 8, 13, 15, 18-19
X A	Tadahiro, K. et al., "Molecular Cloning of p125 <sup>Nck1</sup> , a Protein That Associates with an SH3 Domain of Nck" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1996) Vol. 219, No. 2 p.509-514	1-7, 9-12, 14, 16-17 8, 13, 15, 18-19
X A	Yukari, K. et al., "Interaction of Nck-associated protein 1 with activated GTP-binding protein Rac" Biochem. J. (1997, May) Vol. 322, No. 3 p.873-878	1, 16-17 2-15, 18-19
A	Stefan, B. et al., "The HEM Proteins: A Novel Family of Tissue-specific Transmembrane Proteins Expressed from Invertebrates through Mammals with an Essential Function in Oogenesis" J.Mol. Biol. (1995) Vol. 251, No. 1 p.41-49	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search  
5 March, 1999 (05. 03. 99)

Date of mailing of the international search report  
16 March, 1999 (16. 03. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer



特 許 協 力 条 約

P C T


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 PH-603-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/05646	国際出願日 (日.月.年) 14. 12. 98	優先日 (日.月.年) 15. 12. 97
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>6</sup> C12N15/12, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, C07K14/47, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395, G01N33/53		
出願人 (氏名又は名称) 協和醗酵工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>4</u> ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>          </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎  II <input type="checkbox"/> 優先権  III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如  V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献  VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備  VIII <input checked="" type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 14. 01. 99	国際予備審査報告を作成した日 15. 11. 99	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  引地 進  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9549

# PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

HIRAKI, Yusuke  
Toranomon 5 Mori Building  
3rd floor  
17-1, Toranomon 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 105-0001  
JAPON

Date of mailing (day/month/year)

24 June 1999 (24.06.99)

Applicant's or agent's file reference

PH-603-PCT

### IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/JP98/05646

International filing date (day/month/year)

14 December 1998 (14.12.98)

Priority date (day/month/year)

15 December 1997 (15.12.97)

Applicant

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,CN,EP,IL,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

BG,BR,CA,CZ,EA,HU,MX,NO,NZ,PL,RO,SG,SI,SK,UA,VN

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on

24 June 1999 (24.06.99) under No. WO 99/31239

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))


If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

# 特許協力条約に基づく国際出願

## 願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号		
国際出願日		
(受付印)		
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)		PH-603-PCT

第 I 欄 発明の名称	
ヒト N a p l 蛋白質	
第 II 欄 出願人	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)	
協和醗酵工業株式会社 K Y O W A H A K K O K O G Y O C O . , L T D . 〒100-8185 日本国東京都千代田区大手町一丁目6番1号 6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 Japan	
<input type="checkbox"/> この欄に記載した者は、 発明者でもある。 電話番号: ファクシミリ番号: 加入電信番号:	
国籍 (国名): 日本国 J A P A N	住所 (国名): 日本国 J A P A N
この欄に記載した者は、次の 指定国についての出願人である: <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
第 III 欄 その他の出願人又は発明者	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)	
榊 佳之 S A K A K I Y O S H I Y U K I 〒236-0045 日本国神奈川県横浜市金沢区釜利谷南2-51-42 2-51-42, Kamariyaminami, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 236-0045 Japan	
<input type="checkbox"/> この欄に記載した者は、 次に該当する: <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input checked="" type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 (ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)	
国籍 (国名): 日本国 J A P A N	住所 (国名): 日本国 J A P A N
この欄に記載した者は、次の 指定国についての出願人である: <input checked="" type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
<input type="checkbox"/> その他の出願人又は発明者が縦裏に記載されている。	
第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名	
次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する: <input checked="" type="checkbox"/> 代理人 <input type="checkbox"/> 共通の代表者	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)	
9 1 0 9 弁理士 平 木 祐 輔 HIRAKI Yusuke 〒105-0001 日本国東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3F Toranomom No. 5 Mori Building Third Floor, 17-1, Toranomom 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-0001 Japan	
電話番号: 03- 3503-8637 ファクシミリ番号: 加入電信番号:	

## 第9章 附則 国境の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと： 少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

## A 地域中絶中絶

☐ A P A R I P O 中絶中絶 : G I-I ガーナ Ghana, G M ガンビア Gambia, K E ケニア Kenya, L S レソト Lesotho, M W マラウイ Malawi, S D スーダン Sudan, S Z スワジランド Swaziland, U G ウガンダ Uganda, Z W ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国

☒ E A ユーラシア中絶中絶 : A M アルメニア Armenia, A Z アゼルバイジャン Azerbaijan, B Y ベラルーシ Belarus, K G キルギス Kyrgyzstan, K Z カザフスタン Kazakhstan, M D モルドヴァ Republic of Moldova, R U ロシア Russian Federation, T J タジキスタン Tajikistan, T M トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国

☒ E P ヨーロッパ中絶中絶 : A T オーストリア Austria, B E ベルギー Belgium, C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, C Y キプロス Cyprus, D E ドイツ Germany, D K デンマーク Denmark, E S スペイン Spain, F I フィンランド Finland, F R フランス France, G B 英国 United Kingdom, G R ギリシャ Greece, I E アイルランド Ireland, I T イタリア Italy, L U ルクセンブルグ Luxembourg, M C モナコ Monaco, N L オランダ Netherlands, P T ポルトガル Portugal, S E スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国

☐ O A O A P I 中絶中絶 : B F ブルキナ・ファソ Burkina Faso, B J ベナン Benin, C F 中央アフリカ Central African Republic, C G コンゴ Congo, C I コートジボアール Côte d'Ivoire, C M カメルーン Cameroon, G A ガボン Gabon, G N ギニア Guinea, M L マリ Mali, M R モーリタニア Mauritania, N E ニジェール Niger, S N セネガル Senegal, T D チャード Chad, T G トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

## B 中絶中絶 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

☐ A L アルバニア Albania  
☐ A M アルメニア Armenia  
☐ A T オーストリア Austria  
☒ A U オーストラリア Australia  
☐ A Z アゼルバイジャン Azerbaijan  
☐ B A ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina

☐ B B バルバドス Barbados  
☒ B G ブルガリア Bulgaria  
☒ B R ブラジル Brazil  
☐ B Y ベラルーシ Belarus  
☒ C A カナダ Canada  
☐ C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン  
Switzerland and Liechtenstein

☒ C N 中国 China  
☐ C U キューバ Cuba  
☒ C Z チェコ Czech Republic  
☐ D E ドイツ Germany  
☐ D K デンマーク Denmark  
☐ E E エストニア Estonia  
☐ E S スペイン Spain  
☐ F I フィンランド Finland  
☐ G B 英国 United Kingdom  
☐ G E グルジア Georgia  
☐ G I-I ガーナ Ghana  
☐ G M ガンビア Gambia  
☐ G W ギニア・ビサオ Guinea-Bissau  
☐ H R クロアチア Croatia  
☒ H U ハンガリー Hungary  
☐ I D インドネシア Indonesia  
☒ I L イスラエル Israel  
☐ I S アイスランド Iceland  
☒ J P 日本 Japan  
☐ K E ケニア Kenya  
☐ K G キルギス Kyrgyzstan  
☒ K R 韓国 Republic of Korea  
☐ K Z カザフスタン Kazakhstan  
☐ L C セント・ルシア Saint Lucia  
☐ L K スリ・ランカ Sri Lanka  
☐ L R リベリア Liberia  
☐ L S レソト Lesotho

☐ L T リトアニア Lithuania  
☐ L U ルクセンブルグ Luxembourg  
☐ L V ラトヴィア Latvia  
☐ M D モルドヴァ Republic of Moldova  
☐ M G マダガスカル Madagascar  
☐ M K マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia  
☐ M N モンゴル Mongolia  
☐ M W マラウイ Malawi  
☒ M X メキシコ Mexico  
☒ N O ノルウェー Norway  
☒ N Z ニュー・ジーランド New Zealand  
☒ P L ポーランド Poland  
☐ P T ポルトガル Portugal  
☒ R O ルーマニア Romania  
☐ R U ロシア Russian Federation  
☐ S D スーダン Sudan  
☐ S E スウェーデン Sweden  
☒ S G シンガポール Singapore  
☒ S I スロヴェニア Slovenia  
☒ S K スロヴァキア Slovakia  
☐ S L シェラ・レオネ Sierra Leone  
☐ T J タジキスタン Tajikistan  
☐ T M トルクメニスタン Turkmenistan  
☐ T R トルコ Turkey  
☐ T T トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago  
☒ U A ウクライナ Ukraine  
☐ U G ウガンダ Uganda  
☒ U S 米国 United States of America  
☐ U Z ウズベキスタン Uzbekistan  
☒ V N ヴィエトナム Viet Nam  
☐ Y U ユーゴスラヴィア Yugoslavia  
☐ Z W ジンバブエ Zimbabwe

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定 (国内特許のために) するためのものである

☐ \_\_\_\_\_  
☐ \_\_\_\_\_  
☐ \_\_\_\_\_  
☐ \_\_\_\_\_  
☐ \_\_\_\_\_

この追記欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄……の続き」（欄番号を表示する）と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。：特に、

(i) 出願人又は発明者として3人以上いる場合で、「続続」を使用できないとき。

この場合は、「第III欄の続き」と表示し、第III欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

(ii) 第II欄又は第III欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しているとき。

この場合は、「第II欄の続き」、「第III欄の続き」又は「第II欄及び第III欄の続き」と記載し、該当する出願人の氏名（名称）を表示し、それぞれの氏名（名称）の次にその者が出願人となる指定国（広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許）を記載する。

(iii) 第II欄又は第III欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第II欄の続き」、「第III欄の続き」又は「第II欄及び第III欄の続き」と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国（広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許）を記載する。

(iv) 第IV欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第IV欄の続き」と表示し、第IV欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

(v) 第V欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国の「継続」又は「一部継続」を伴うとき。

この場合は、「第V欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(vi) 第VI欄において優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第VI欄の続き」と表示し、第VI欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

(vii) 第VI欄において先の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第VI欄の続き」と表示し、その先の出願に対応する項目の番号を特定して、更に、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を表示する。

2. 出願人が、第V欄における権利の指定の宣言に関し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「権利の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記載し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。

3. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する解説」と表示し、以下にその内容を記述する。

[IV欄の続き]

9 6 1.8

弁理士

石 井 貞 次

ISHII Sadaji

あて名はIV欄の記載と同じ

The same address as Box IV



第VI欄 出願の先の特許番号		<input type="checkbox"/> 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている		
先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 15.12.97	平成9年特許願 第363183号	日本国 Japan		
(2)				
(3)				

☒ 上記( )の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の( )の番号のものについては、出願書類の認証原本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。 (1)

\*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関の選択		先の調査結果の利用の請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）	
ISA / J P		出願日 (日、月、年)	出願番号
		国名（又は広域官庁）	

第VIII欄 照会事項：出願の審査	
この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。	この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。
願書 ..... 4 枚	1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙
明細書（配列表を除く）..... 46 枚	<input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
請求の範囲 ..... 2 枚	<input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
要約書 ..... 1 枚	2. <input checked="" type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状
図面 ..... 5 枚	3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し
明細書の配列表 ..... 31 枚	4. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の説明書
合 計 ..... 89 枚	5. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記第VI欄の( )の番号を記載する）
	6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）
	7. <input checked="" type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
	8. <input checked="" type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）
	9. <input checked="" type="checkbox"/> その他（書類名を詳細に記載する）
要約書とともに提示する図面：	本国際出願の使用言語名： 日本語

第IX欄 提出者の記名押印	
各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。	
平木 祐輔	石井 貞次
	

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日		2. 図面	
3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）		<input type="checkbox"/> 受理された	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日		<input type="checkbox"/> 不足図面がある	
5. 出願人により特定された 国際調査機関	ISA / J P	6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない	

<b>Box No. VI PRIORITY CLAIM</b>					<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:			
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office	
item (1) 15.12.97	363183/1997	Japan			
item (2)					
item (3)					

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

\* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

<b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>			
Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):		Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):	
ISA / JP		Date (day/month/year)	Number Country (or regional Office)

<b>Box No. VIII CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING</b>	
This international application contains the following number of sheets: request : 4 description (excluding sequence listing part) : 46 claims : 2 abstract : 1 drawings : 5 sequence listing part of description : 31 <b>Total number of sheets : 89</b>	This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input checked="" type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input checked="" type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input checked="" type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input checked="" type="checkbox"/> other (specify): Request for transmittal of priority document, written statement, and document providing information about FD record format, etc.
Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application: Japanese

<b>Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT</b>	
<i>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</i>	
HIRAKI Yusuke  (sealed)	ISHII Sadaji  (sealed)

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application: 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2): 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / JP	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received:  <input type="checkbox"/> not received:  6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

Date of receipt of the record copy

For International Bureau use only

09/581478<sup>8</sup>  
PCT/JP 98/05646

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

14.12.98

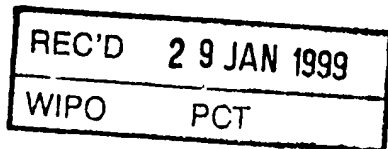
5

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1997年12月15日



出願番号  
Application Number:

平成 9 年特許願第 3 6 3 1 8 3 号

出願人  
Applicant(s):

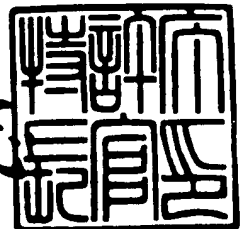
協和醗酵工業株式会社  
榊 佳之

PRIORITY DOCUMENT

1999年 1月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志





【書類名】 特許願

【整理番号】 H09-0551Q3

【提出日】 平成 9年12月15日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 ヒト N a p 1 蛋白質

【請求項の数】 19

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区釜利谷南 2-51-42

    【氏名】 榊 佳之

【特許出願人】

    【識別番号】 000001029

    【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【特許出願人】

    【識別番号】 597138830

    【氏名又は名称】 榊 佳之

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 平木 祐輔

【代理人】

    【識別番号】 100096183

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 015244

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

特平 9-363183

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒトNap1蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するヒトNap1蛋白質、または配列番号2で表わされるアミノ酸配列において、一個以上のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、アポトーシス抑制活性を有する蛋白質。

【請求項2】 請求項1記載の蛋白質をコードするDNA。

【請求項3】 配列番号1記載の塩基配列を有する請求項2記載のDNA。

【請求項4】 請求項2または3記載のDNAの塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アポトーシス抑制活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項5】 請求項2～4記載のDNAとベクターとからなる組換えベクター。

【請求項6】 請求項5記載のベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項7】 請求項6記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項1記載の蛋白質を生成蓄積させ、得られる培養物から蛋白質を採取することを特徴とする前記蛋白質の製造方法。

【請求項8】 請求項1記載の蛋白質を有効成分として含むアルツハイマー病治療薬。

【請求項9】 請求項2～4記載のDNAの塩基配列中の連続した5～60残基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、または該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項10】 配列番号18または19で表わされる塩基配列を有する請求項9記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項11】 配列番号27または29で表わされる塩基配列を有する請求項9記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項12】 請求項9または10記載のオリゴヌクレオチドを用いた、

ヒトN a p 1 遺伝子のmRNAの検出法。

【請求項13】 請求項9または10記載のオリゴヌクレオチドを含有する、アルツハイマー病の診断薬。

【請求項14】 請求項9または11記載のオリゴヌクレオチドを用いた、ヒトN a p 1 遺伝子の転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

【請求項15】 請求項9または11記載のオリゴヌクレオチドを含有する、アポトーシスが関与する疾患の治療薬。

【請求項16】 請求項1記載の蛋白質を認識する抗体。

【請求項17】 請求項16記載の抗体を用いた、請求項1記載の蛋白質の免疫学的検出法。

【請求項18】 請求項16記載の抗体を含有する、アルツハイマー病診断薬。

【請求項19】 請求項16記載の抗体を有効成分として含有する、アポトーシスが関与する疾患の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒトN a p 1 蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質の製造方法、該蛋白質を認識する抗体及び該蛋白質の用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

アルツハイマー病は、進行性の脳神経変性疾患であり、老人性痴呆原因の一つである。アルツハイマー病には遺伝子の変異が原因と考えられる家族性のものと散発性のものがあるが、大部分は散発性である。その病理面での特徴は、家族性、散発性どちらも、神経細胞の脱落および大量死による脳の萎縮、神経細胞内の神経原繊維変化とよばれる変性、老人斑とよばれるアミロイド繊維の細胞間隙への沈着等があげられる。その発症に関与する因子について多くの研究がなされているが、これらの障害に至る生化学的な機構はあまり解明されていない。

【0003】

家族性アルツハイマー病は、遺伝子変異が原因で発症すると考えられている。そして、家族性アルツハイマー病の遺伝子解析から、アルツハイマー病関連遺伝子として、 $\beta$ -アミロイド前駆体蛋白 [ネイチャー (Nature), 325, 733 (1987)]、プレセニリン (presenilin) 1 [Nature, 375, 754 (1995)]、プレセニリン 2 [サイエンス (Science), 269, 973 (1995)] が報告されている。また発症の危険因子と考えられる遺伝子として、アポリポ蛋白 E (apolipoprotein E; apo E) の対立遺伝子多型のうちの 4 型が報告されている [Science, 261, 921 (1993)]。

【0004】

正常細胞における実験において、 $\beta$ -アミロイド前駆体蛋白の変異型遺伝子を細胞に導入し発現させると、アポトーシスが誘導されたという報告 [Science, 272, 1349 (1996)]、 $\beta$ -アミロイド前駆体蛋白から生成する  $\beta$ -アミロイドペプチドを神経細胞に投与すると細胞死を誘導したという報告 [Science, 245, 417 (1989)]、 $\beta$ -アミロイドペプチドの一部分にあたるペプチドがアポトーシスを誘導したという報告 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 90, 7951 (1993)] があるが、上記の遺伝子がどのように神経細胞死、アルツハイマー病の発症に関与しているのかについてはまだ不明な点が多い。

【0005】

これに対し、アルツハイマー病の患者の神経細胞ではアポトーシスが生ずることが知られているが [エクスペリメンタル・ニューロロジー (Experimental Neurology), 133, 225, (1995)]、このような神経細胞におけるアポトーシスが、 $\beta$ -アミロイド前駆体蛋白等が関与するアポトーシスと同様の機構によるものであれば、アポトーシスを抑制することにより神経細胞死が抑制され、アルツハイマー病の予防や治療になると考えられる。

【0006】

一方、散発性のアルツハイマー病はアルツハイマー病の大部分を占めるが、そ

死の機構は散発性のアルツハイマー病にも関与しているのかも不明である。

ところで、Nck会合蛋白質 (Nck associated protein; 以下、Napと略記する) は、ウシ脳抽出物中の125 kDaの蛋白質として同定されたものであり、細胞内情報伝達分子Nckの第1番目のSH3ドメインに、特異的ではあるが間接的な結合をする蛋白質である [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochemical and Biophysical Research Communication), 219, 509 (1996)]。

【0007】

これまでにマウスNap1蛋白質、及びラットNap1蛋白質をコードするcDNAが得られている。すなわち、ウシ脳より精製したNap1蛋白質の部分アミノ酸配列から、マウス小脳由来のcDNAクローンH19 [ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス (European Journal of Neuroscience), 2, 704 (1990)] がマウスNap1の部分長のcDNAクローンであると推察し、H19のcDNAをプローブにしてラット脳cDNAライブラリーからスクリーニングを行った結果、ラットNap1の完全長cDNAが得られた。このcDNAは1128アミノ酸からなるラットNap1蛋白質をコードしていた [Biochem. Biophys. Res. Commun. 219, 509 (1996)]。

【0008】

なお、ラットNap1にホモロジーをもつ蛋白質として、ヒトの血球細胞に特異的に発現している遺伝子としてクローン化されたヒトHem-1 cDNA [バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ (Biochimica et Biophysica Acta), 1090, 241 (1991)]、卵細胞形成および初期胚発生に重要な役割を果たしていると考えられるショウジョウバエの遺伝子dhem-2 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 251, 41 (1995)]、並びにラット脳cDNAライブラリーよりH19 cDNAをプローブにして得られたラットHem-2 cDNA [J. Mol. Biol., 251, 41 (1995)] におけるこれらの遺伝子の発現産物が知られている。それぞれの蛋白質とラットNap1

d h e m-2が60%、ラットH e m-2は94%という非常に高い値である。

【0009】

N a p 1が会合しているN c kは、377アミノ酸からなる細胞内蛋白質であり、SH2ドメインと3つのSH3ドメインを有している[ヌクレイック・アシ  
ツズ・リサーチ (Nucleic Acids Research) , 18, 1048 (1990)]。一般に、S  
H2ドメインはリン酸化チロシンを含むドメインと結合し、SH3ドメインはプ  
ロリンを多く含むドメインと結合する性質を有すると考えられており、これらの  
ドメインをもつ分子は、細胞内情報伝達に関与していると考えられている。すな  
わち、多くの細胞増殖因子のリセプターは細胞内にチロシンキナーゼ活性をもつ  
ドメインをもっており、リガンドとの結合によりそのチロシンキナーゼが活性化  
され、自己又は他の分子のチロシン残基をリン酸化することで情報伝達を開始さ  
れると考えられている。例えば、N c kは、そのSH2ドメインを介して、上皮  
増殖因子 (Epidermal Growth Factor ; E G F)、血小板由来増殖因子 (Platele  
t derived growth factor ; P D G F)、血管内皮増殖因子 (vascular endothel  
ial growth factor ; V E G F)、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor  
; H G F)等の細胞増殖因子のチロシンキナーゼ型リセプターの自己リン酸化チ  
ロシンと結合し、リン酸化を受けることが報告されている[Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA, 89, 8894 (1992)、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー  
(Molecular & Cellular Biology) , 12, 5824 (1992)、ジャーナル・オブ・バ  
イオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry) , 270, 6729  
(1995)、バイオケミストリー・アンド・モレキュラー・バイオロジー・インタ  
ーナショナル (Biochemistry & Molecular Biology International) , 36, 465  
(1995)]。

【0010】

N c kのSH3ドメインと結合する分子としては、P A K (p21ras-activated  
kinase) や、p 2 1 r a sのグアニンヌクレオチド交換による活性化因子S o  
s、セリン/スレオニンキナーゼであるN A K (Nck-associated kinase)、種  
々のリセプター刺激によりリン酸化されるプロトオンコジーン (proto-oncogene

伝子でもある S A K A P I I (Src A box Nck-associated protein II) が報告されている [J. Biol. Chem., 270, 22731 (1995)、Mol. Cell. Biol., 15, 1169 (1995)、J. Biol. Chem., 270, 7359 (1995)、J. Biol. Chem., 269, 17363 (1994)、Mol. Cell. Biol., 15, 5725 (1995)]。

#### 【0011】

このような結合分子から、N c k は主に細胞増殖因子やガン遺伝子などの細胞増殖の情報伝達の系において重要な役割をしていると考えられる。実際、繊維芽細胞である N I H 3 T 3 細胞や 3 Y 1 細胞で N c k を強制的に発現させたところ、ガン細胞にトランスフォームしたことが報告されている [Mol. Cell. Biol., 12, 5824 (1992)、Mol. Cell. Biol., 12, 5834 (1992)]。また、P C 1 2 細胞は、神経成長因子 (Nerve derived growth factor; N G F) により神経細胞に分化し、増殖を停止して神経突起を出す、P C 1 2 細胞に N c k を強制的に発現させたところ、N G F を細胞に投与しても分化が抑制され、増殖が続いたことが報告されている [オンコジーン (oncogene), 12 2351 (1996)]。また、N c k がプロトオンコジーンである転写因子 f o s のプロモーターを活性化したという報告もある [Mol. Cell. Biol., 15, 1169 (1995)]。

#### 【0012】

従って、N c k の S H 3 ドメインと特異的に会合している分子である N a p 1 も、細胞増殖の系に何らかの働きをしていると考えられる。

しかしながら、その直接の機能や作用は不明である。また、N a p 1 のアルツハイマー病との関連を示す報告やアポトーシス抑制作用を持つという報告はない。さらに、ヒトの N a p 1 遺伝子や蛋白についての情報は、E S T (Expressed Sequence Tag; c D N A ライブラリー中の多数の c D N A クローンの 3' 端および 5' 端の塩基配列情報を重複を含めて集めたもの) としてラット H e m - 2 あるいはマウス H 1 9 とホモロジーのあるヒト c D N A クローンの 5' 端部分の塩基配列のいくつかについて、塩基配列データベース GenBank 中に報告されているだけであり、その全体の構造については不明である。

そこで、アルツハイマー病の診断、予防、治療のために、アルツハイマー病に



【0013】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ヒトNap1蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質の製造方法、該蛋白質を認識する抗体及び該蛋白質の用途を提供することを目的とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、アルツハイマー病に関連するヒトNap1 (Nck associated protein 1)蛋白質を単離し、該蛋白質をコードするDNAをクローニングすることに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、アルツハイマー病に関連するヒトNap1蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAの取得方法、該DNAとベクターからなる組み換えベクター、該組み換えベクターを宿主に導入して得られる形質転換体、該形質転換体を用いた上記DNAのコードするヒトNap1蛋白質の製造法、該蛋白質を認識する抗体、上記蛋白質、DNA、抗体を用いたアルツハイマー病の診断薬並びに診断法、および、上記蛋白質を用いたアルツハイマー病の治療薬、上記DNA、抗体を用いたアポトーシスの関与する疾患の診断、予防、治療に関する。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明の蛋白質としては、配列番号2で表わされるアミノ酸配列を有するヒトNap1蛋白質、または、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質のアミノ酸配列において、一個以上のアミノ酸が置換、欠失または付加したアミノ酸配列を有し、かつ、アポトーシス抑制活性を有する蛋白質等をあげることができる。

【0016】

本発明の蛋白質のうち、一個以上のアミノ酸が置換、欠失または付加したアミ

Res., 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT WO 85/00817(1985)、Nature, 316, 601 (1985)、ジーン (Gene) , 34, 315 (1985)、Nucl. Acids Res., 13, 4431 (1985)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology) , 8章 Mutagenesis of Cloned DNA, John Wiley & Sons, Inc. (1989)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0017】

本発明のDNAとしては、本発明の蛋白質をコードするDNA、配列番号1で表わされる塩基配列を有するDNA、および、該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAをあげることができる。

「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNA」とは、配列番号1で表される塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1×~2×SSC (saline-sodium citrate) 溶液 [1×SSC溶液 (150mM NaCl、15mM クエン酸ナトリウム) ; n×はn倍濃度の溶液を示す。]を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A laboratory manual)、第2版 [サンプブック (Sambrook)、フリッチ (Fritsch)、マニアチス (Maniatis)編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊、以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略す]等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、更に好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげて

ができる。

【0018】

さらに、本発明のDNAのなかには、上述した本発明のDNAの一部の塩基配列を有するDNA、または該DNAと相補的な配列を有するDNAも含まれる。本発明のDNAの一部の塩基配列を有するDNAとしては、例えば、配列番号1で表される塩基配列中の連続した5～60残基、好ましくは10～40残基の塩基配列と同じ配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができ、本発明のDNAの一部の塩基配列を有するDNAと相補的な配列を有するDNAとしては、例えば、該オリゴヌクレオチドのアンチセンス・オリゴヌクレオチドをあげることができる。該オリゴヌクレオチドとして、例えば配列番号18、アンチセンス・オリゴヌクレオチドとして、例えば配列番号27および29で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド等をあげることができる。

【0019】

以下、本発明を詳細に説明する。なお、本文中の常法とは、「モレキュラー・クローニング 第2版」等の実験書に記載の方法を示す。

1. アルツハイマー病と関連するDNAの調製

散発性アルツハイマー病の分子的機構を解明するためには、発症に関与する分子を見出すことが重要である。散発性アルツハイマー病患者とアルツハイマー病でない人の脳で発現パターンの異なる、すなわち量的な変動を示す遺伝子の探索は、発症の関与分子を見出す手がかりとなる。そこで、散発性アルツハイマー病患者とアルツハイマー病でない人の脳におけるmRNAの発現の変動に注目し、ディファレンシャル・ディスプレイ法[Science, 257, 967 (1992)、FEBS Letters (FEBS Letters), 351, 231 (1994)]を利用し、アルツハイマー病発症に関連するDNAを調製する。

【0020】

すなわち、まず散発性アルツハイマー病患者とアルツハイマー病でない人の脳から全RNAを調製する。脳組織から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法[メソッズ・イン・エンザイモ

1937 (1991)] などがあげられる。

【0021】

また全RNAからポリ (A) + RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング 第2版) などがあげられる。

さらに、ファースト・トラック・mRNA・アイソレーション・キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA・ピュリフィケーション・キット [Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] などのキットを用いて脳組織から直接mRNAを調製することもできる。

【0022】

脳組織より抽出した上記各々のRNAから、アンカープライマーを用いて常法によりcDNAを合成し、続いて、これら各々のcDNAに対してアンカープライマーと任意のプライマーを用いてPCRを行い、cDNAを増幅する。

アンカープライマーとは、mRNAの3'末端ポリA配列に会合するオリゴdT配列の3'末端に、チミジンを除く、アデニン、グアニンあるいはシトシンのオリゴヌクレオチドを付加したプライマーであり、例えば、配列番号4～6に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをあげることができる。

【0023】

任意プライマーとは、多種類のcDNAの配列に対して増幅し、かつ一度の反応で多数のcDNA増幅断片を得ることができるオリゴヌクレオチドのことであり、オペロン・テクノロジーズ (Operon Technologies) 社製のOPA-1～20、OPB-1～20、OPC-1～20、OPD-1～20等をあげることができる。任意プライマーの長さとしては、10～20塩基程度が好ましい。

【0024】

続いて、PCRにより増幅された上記各々のcDNAを、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、サイバーグリーンIなどのDNA特異的な蛍光染色剤で、増幅されたcDNAを蛍光染色し、その蛍光量をフルオロイメジャーを用いて測定する。また、PCRを行う

際、あらかじめ5'末端を蛍光標識したアンカープライマーを用いると、蛍光染色剤を使用しなくても電気泳動後すぐにバンドの蛍光量を測定することができる。プライマーの5'端の蛍光標識はフルオレセイン・イソチオシアネートを用いて常法により行うことができる。

#### 【0025】

各々のバンドの蛍光量を比較し、蛍光量の変動しているバンドの位置に相当するゲルを切り出して、切り出したゲルを反応液に入れて再度PCRを行い、ゲル中のDNA断片を増幅させる。

該増幅DNA断片をそのままあるいはp f u DNAポリメラーゼにより末端を平滑化後、常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいはDNAシーケンサー 373A [パーキン・エルマー (Perkin Elmer) 社製] 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。

#### 【0026】

該増幅DNA断片を組み込むベクターとしては、pCR-Script Amp [ストラタジーン (Stratagene) 社製、ストラテジーズ (Strategies), 5, 6265 (1992)]、pT7Blue T-Vector [ノバジェン (Novagen) 社製]、pCR2.1 [インビトロジェン社製、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 9, 657 (1991)]、pCR-TRAP [ゲンハンター (GenHunter) 社製]、pTA (ニッポンジーン社) およびpNoTAT 7 [5プライム→3プライム (5'→3') 社製]などをあげることができる。

#### 【0027】

このようにして決定された塩基配列の新規性は、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の塩基配列と一致すると考えられるような明らかな相同性を示す塩基配列がないことにより確認できる。

上記のようにして取得されたDNAとして、例えば、配列番号3で表される配列を有するDNA等をあげることができる。

上述の方法で得られたDNAが、アルツハイマー病患者の脳で発現の変動している遺伝子のmRNAに対応するcDNAの部分DNA断片であった場合には、下記(1)、(2)または(3)の方法によりcDNA全長を得ることができる。

#### (1) cDNAライブラリーの利用

上記DNA断片をプローブとして、各種cDNAライブラリーを用いたハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行うことにより、cDNA全長を得ることができる。

#### 【0029】

以下にcDNAライブラリーの作製法について述べる。

cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング 第2版 やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology)、サプルメント1〜34 (Supplement 1~34)、グリーン・パブリッシング・アソシエイツ・アンド・ウェイリーインターサイエンス (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)、1987-1996年版、以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプルメント1〜34と略記する]等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ライフ・テクノロジーズ (Life Technologies) 社製] やザップー cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法などがあげられる。さらに、cDNAライブラリーそのものの市販品、例えばクローンテック (Clontech) 社のヒト脳cDNAライブラリー等を利用することができる。

#### 【0030】

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社

ッド・リサーチ (Nucleic Acids Research) , 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNAクローニング、ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning, A Practical Approach) , 1, 49 (1985)]、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T3 18U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] およびpUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

【0031】

宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [ジェネティックス (Genetics) , 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] およびEscherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

【0032】

cDNAライブラリーからのcDNAクローンの選択としては、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング 第2版) により選択することができる。

選択されたクローンは常法により目的とするDNAを取得することができる。

(2) 上述の方法によりmRNAよりcDNAを合成し、該cDNAの両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と増幅断片の塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) および3'-RACE [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)] により、増幅断片より5'端側および3'端側のcDNAを得ることができる。得られたcDNAおよび増幅断片をつなぎあわせることにより目的とするDNAを取得することができる。

(3) (1) あるいは (2) の方法で得られた全長cDNAの5'端側と3'

端の塩基配列に基づいたプライマーを調製し、mRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR [PCR・プロトコルズ (PCR Protocols), アカデミック・プレス (Academic Press) (1990)] を行うことにより目的とするDNAを取得することができる。

【0033】

これらの方法により取得されたDNAの塩基配列は、上述の塩基配列の決定方法により決定することができる。該配列の新規性に関しても上述の方法により確認することができる。上記方法により確認された新規な塩基配列を有するDNAとして、例えば、配列番号1で表される配列を有するDNA等をあげることができる。また、配列番号2に本発明のヒトNap1蛋白質のアミノ酸配列を例示するが、このアミノ酸配列からなるタンパク質がアポトーシス抑制活性を有する限り、当該アミノ酸配列において1個以上（好ましくは1若しくは数個）のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。例えば、配列番号2で表わされるアミノ酸配列の第1番目のメチオニンが欠失した配列を有するものなども、アポトーシス抑制活性を有する限り本発明の蛋白質に含まれる。

【0034】

なお、変異の導入は、公知の手法により、あるいは市販のキット（CLONETECH社のSite-Directed Mutagenesis Kit等）を用いて行うことができる。

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

【0035】

該DNAおよびDNA断片を用いて、常法あるいはDNA合成機により、アポトーシスに関与するDNAの一部の配列を有するオリゴヌクレオチドおよびアンチセンス・オリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドまたはアンチセンス・オリゴヌクレオチドとして、例え



当するセンスプライマー、3'末端側の塩基配列に相当するアンチセンスプライマー等をあげることができる。ただし、mRNAにおいてウラシルに相当する塩基は、オリゴヌクレオチドプライマーにおいてはチミジンとなる。

#### 【0036】

センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとしては、それぞれの融解温度(T<sub>m</sub>)および塩基数が極端に変わることはないオリゴヌクレオチドで、10～40塩基数のものが好ましい。

ヒトNap1のDNAの一部の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドまたはアンチセンス・オリゴヌクレオチドとして、例えば、配列番号18、19または27、29で表される塩基配列を有するヌクレオチドをあげることができる。

また、本発明においては、該ヌクレオチドの誘導体も用いることができ、例えば、該ヌクレオチドのメチル体やフォスフォロチオエート体をあげることができる。

#### 【0037】

### 2. ヒトNap1蛋白質の調製

上記1.に記載の方法により取得したヒトNap1 DNAを宿主細胞中で発現させるために、モレキュラー・クローニング 第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1～34等に記載された方法等を用いることができる。すなわち、本発明の蛋白質をコードするDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより、本発明の蛋白質を発現する形質転換体を得ることができる。

#### 【0038】

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なものは染色体中への組込が可能で、本発明の蛋白質を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

クターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、ヒトNap1遺伝子及び転写終結配列により構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

#### 【0039】

発現ベクターとしては、例えば、pKK233-2 (ファルマシア社)、pSE280 (インビトロジェン社)、pGEMEX-1 [プロメガ(Promega)社]、pQE-8 (キアゲン(QIAGEN)社)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [アグリカルチュラル・バイオリジカル・ケミストリー (Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)) ]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (ストラタジーン社)、pTrs30 [*Escherichia coli* JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [*Escherichia coli* JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pGKA2 [*Escherichia coli* IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭60-221091]、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pGEX (ファルマシア社)、pETシステム (ノバジェン社)、pSupex等を例示することができる。

#### 【0040】

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、t r pプロモーター (P t r p)、l a cプロモーター、P Lプロモーター、P Rプロモーター、T 7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。また P t r p を2つ直列させたプロモーター (P t r p × 2)、t a cプロモーター、l a c T 7プロモーター、l e t Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

#### 【0041】

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0042】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniophilum ATCC15354 等をあげることができる。

【0043】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942) 等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE P13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等を用いることができる。

【0044】

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$ 1 プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)

ペロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルラン  
ス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomy  
ces alluvius) 等をあげることができる。

## 【0045】

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればい  
ずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzym  
ol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8  
4, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J.  
Bacteriol.), 153, 163 (1983)] 等をあげることができる。

## 【0046】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE10  
7 [特開平3-22979; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pc  
DNAI/Amp (インビトロジェン社製)、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE103  
[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 101, 130  
7 (1987)]、pAGE210等が用いられる。

## 【0047】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いる  
ことができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate earl  
y) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネ  
インのプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子の  
エンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

## 【0048】

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞  
であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT  
5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれ  
ばいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechno

ション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0049】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーサプリメント 1-34、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。

【0050】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

【0051】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などを用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf 9、Sf 21 [バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W.H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

【0052】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクタ

(特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等をおこなうことができる。酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

【0053】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明の蛋白質を製造することができる。本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0054】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等が用いられることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

【0055】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中、pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0056】

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0057】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で行う。培養温度は35～37℃がよく、培養時間は、通常3～7日間である。

【0058】

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーミンジェン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell 1400、ExCell 1405〔いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Bioscience) 社製〕等を用いることができる。

【0059】

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させた蛋白質を単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

#### 【0060】

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）セファロース、DIAION HPA-75（三菱化学社製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（ファルマシア社製）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

#### 【0061】

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

#### 【0062】

本発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することがで



り可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

#### 【0063】

また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易（米国Advanced ChemTech社製）、パーキンエルマージャパン（米国Perkin-Elmer社製）、ファルマシアバイオテック（スウェーデンPharmacia Biotech社製）、アロカ（米国Protein Technology Instrument社製）、クラボウ（米国Synthecell-Vega社製）、日本パーセプティブ・リミテッド（米国PerSeptive社製）、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

#### 【0064】

### 3. アルツハイマー関連抗体の調製

抗体としては、上記の蛋白質またはポリペプチドに特異的に結合できるものであれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等いずれの抗体であってもよい。

ポリクローナル抗体は、抗原を免役した動物から得られる血清を分離、精製することにより調製することができる。モノクローナル抗体は、抗原を免疫した動物から得られる抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

#### 【0065】

抗原は、各種ヒト培養細胞から本発明の蛋白質を精製するか、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または配列番号2に示されるアミノ酸配列のうち1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつアポトーシス抑制活性を有する蛋白質をコードするDNAを含む組換えベクターを大腸菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞などの宿主に導入して、蛋白質を発現させて得られる蛋白質を分離、精製することにより調製できる

ドをアミノ酸合成機を用いて合成することによっても調製できる。

【0066】

免疫する方法としては、抗原をウサギ、ヤギまたは3～20週令のラット、マウスもしくはハムスター等、非ヒト哺乳動物の皮下、静脈内または腹腔内にそのまま投与してもよいが、抗原をスカシガイヘモシアニン、キーホールリンベツトヘモシアニン、牛血清アルブミン、牛チログロブリン等、抗原性の高いキャリアタンパク質とを結合させて投与したり、フロインドの完全アジュバント (Complete Freund's Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチン等、適当なアジュバントとともに投与することが好ましい。

【0067】

抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応するか否かを酵素免疫測定法 (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) 等に従い、抗体価を測定することにより調べる。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示す非ヒトほ乳動物を、血清または抗体産生細胞の供給源とする。

【0068】

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒトほ乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

【0069】

抗体産生細胞としては、脾細胞、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞、特に脾細胞が好適に用いられる。

骨髓腫細胞としては、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株であるP3-X63Ag8-U1(P3-U1)株 [Current Topics in Microbiology and Immuno

511-519 (1976)]、SP2/O-Ag14(SP-2)株 [Nature, 276, 269-270 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653)株 [J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63)株 [Nature, 256, 495-497 (1975)] 等、マウス由来の株化細胞が好適に用いられる。

【0070】

ハイブリドーマ細胞は、以下の方法により作製できる。

抗体産生細胞と骨髄腫細胞を混合し、HAT培地〔正常培地にヒポキサンチン、チミジンおよびアミノプテリンを加えた培地〕に懸濁したのち、7～14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとり酵素免疫測定法などにより、抗原に反応し、抗原を含まない蛋白質には反応しないものを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞として選択する。

【0071】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、またはハイブリドーマ細胞を動物の腹腔内に投与して該動物を腹水癌化させて得られる腹水から分離、精製することにより調製できる。

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、硫酸沈殿、カプリル酸沈殿、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインA若しくはG-カラム、若しくはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等による方法を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

【0072】

4. ヒトNap1のDNA、蛋白質または抗体の利用

(1) 1. 記載のDNAを用い、ノーザン・ハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング 第2版)、PCR法 [PCR Protocols, (1990)]、RT (reverse-transcribed) - PCR法等により、本発明のヒトNap1遺伝子のmRNAを検出することができる。

【0073】

織におけるヒトN a p 1 遺伝子のmRNAを検出し、その発現量を健常者と被験者とで比較し、発現量が低下しているかどうかを調べることにより、被験者でのアルツハイマー病の診断を行うことができる。

mRNAの発現量は、ノーザン・ハイブリダイゼーション法の場合は、ハイブリダイズしたプローブの量をプローブの標識に応じて、例えば<sup>32</sup>P標識の場合は放射エネルギーを、蛍光標識の場合は蛍光量を測定することにより測定できる。RT-PCR法の場合は、例えば増幅断片をエチジウムブロミドやサイバーグリーンIなどのDNA特異的な蛍光染色剤で染色し、その蛍光量を測定することにより測定できる。

【0074】

(3) 本発明のDNAを用い、体細胞ハイブリッド形成法 [Annual Review of Genetics, 9, 407 (1975)] や in situ ハイブリダイゼーション法を行うことにより、ヒトN a p 1 遺伝子の存在する染色体の位置を決定することができる。

体細胞ハイブリッド形成法では、以下のようにしてヒトN a p 1 遺伝子の存在する染色体の番号を決定する。まず、ヒト細胞とマウスまたはハムスターの株細胞を融合させたハイブリッド細胞を継代培養していくと1、2個のヒト染色体だけが残ったハイブリッド細胞クローンが得られることを利用して、残ったヒト染色体を特定して、23種類のヒト染色体をカバーするような一連のハイブリッド細胞クローンのパネルを用意する。このようなハイブリッド細胞のパネルは、バイオス・ラボラトリーズ社等から市販されている。パネルのそれぞれの細胞からゲノムDNAを調製し、このゲノムDNAを鋳型にしてヒトN a p 1 特異的なプライマーを用いてPCRを行い、ヒトN a p 1 遺伝子に相当するDNA断片の増幅を調べる。そして、増幅がみられた細胞に含まれるヒト染色体上に、ヒトN a p 1 遺伝子が存在すると判定できる。

【0075】

一方、in situ ハイブリダイゼーション法 [Annals of Human Genetics, 45, 135 (1981), Cell, 52, 51 (1988)] では、まず、ヒト染色体の標本に対し、本発明のヒトN a p 1 DNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行う。

置を特定する。これにより、ヒトN a p 1遺伝子の存在する染色体の番号だけでなく、その染色体上での物理的な位置を特定することができる。プローブは、放射性同位体<sup>3</sup>Hや、ビオチンにより標識し、<sup>3</sup>H標識ではオートラジオグラフにより、ビオチン標識では、蛍光色素F I T Cで標識したアビジンを用いてシグナルを検出することができる。

【0076】

(4) 1. 記載のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを細胞に導入し、N a p 1遺伝子の転写や翻訳を抑制することにより細胞にアポトーシスを誘導することができる。アンチセンス・オリゴヌクレオチドの導入方法は、組換えベクターの導入方法と同様にして行うことができる。また、細胞のアポトーシス検出法としては(i)顕微鏡観察、(ii)T U N E L法、(iii)DNAラダー検出法(iv)DNAの断片化率の定量、(v)細胞のサイズ分布測定等が挙げられる[最新アポトーシス実験法 羊土社 (1995)]。

【0077】

顕微鏡観察では、アポトーシスに特徴的な細胞形態変化、例えば核の濃縮、クロマチンの凝縮、細胞小器官の萎縮、アポトーシス小体の形成、細胞全体の収縮等を観察する。T U N E L法は、アポトーシスによって生ずるDNAの切断末端をterminal deoxynucleotidyl transferase (T d T)を用いてビオチンやジゴキシゲニンで標識することにより検出する方法である。DNAラダー検出法は、アポトーシスによっておこるクロマチンDNAの断片化を、細胞からDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動をすることにより検出する方法で、断片化したDNAがラダー(はしご)状に検出される。DNAの断片化率の定量は、断片化した低分子DNAのみを抽出し、ジフェニルアミンを用いてDNAの定量を行う方法である。細胞サイズ分布測定は、アポトーシスにより細胞の収縮や断片化がおこり小さなサイズの細胞が増加するのを、コールター・マルチサイザー(Coulter multisizer)等の粒子サイズ測定装置を利用して測定する方法である。これらの方法により、細胞がアポトーシスをおこしているかどうかを検出することができる。

(5) 1. 記載のアンチセンス・オリゴヌクレオチド (RNA/DNA) を用いて [化学、46, 681 (1991)、Bio/Technology, 9, 358 (1992)]、DNAの転写もしくはmRNAの翻訳を抑制することにより、アポトーシスを誘導し、アポトーシスの抑制が病態に関与している疾患の治療に利用することができる。

例えば、オリゴヌクレオチドは、細胞への取り込みを助けるための、細胞膜との親和性の高い適当な担体、例えばリポソームやコレステロール等と共に患者の患部又は全身に注射により投与し、患者の細胞に取り込ませてアポトーシスを誘導することにより、治療することができる。

【0079】

アポトーシスの抑制が病態に関与している疾患として、例えば、ガンあるいは全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、多発性硬化症等の自己免疫疾患等をあげることができる。

多くのガン細胞において、アポトーシス誘導因子であるp53等の遺伝子に欠失等の変異が見出されている [ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー (British Journal of Cancer), 68, 653 (1993)]。そして、このような細胞では、通常の組織では遺伝子の変異等の異常が起きた細胞を排除しているアポトーシス機構が働かなくなるため、ガン細胞の増殖が進行していくと考えられている。また多くの細胞でアポトーシス抑制遺伝子として働くbcl-2のアンチセンス・オリゴDNAが動物実験においてヒトの結腸ガンの成長を抑止させることができるという報告 (日経バイオ最新用語辞典、日経BP社 1995年) もある。

【0080】

従って、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて本発明の遺伝子の発現を抑制し、アポトーシス発現を誘導することにより、アポトーシス関連のガンの治療に利用することができる。

一方、自己免疫疾患は、通常アポトーシスにより排除されてしまう自己反応性T細胞が排除されないために発症すると考えられ、この機構で重要なアポトーシス誘導遺伝子とされているFas遺伝子の変異型、又はFas蛋白質のリガンド

s 蛋白質のリガンドの発現が抑制されて自己免疫疾患症状を呈することが知られている [Nature, 356, 317 (1992)、セル (Cell) , 75, 1169 (1993)]。

【0081】

従って、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて本発明の遺伝子の発現を抑制し、アポトーシス発現を誘導することにより、自己免疫疾患を治療することができる。

(6) 1. 記載のDNAを用い、2. 記載の方法によりヒトNap1蛋白質を取得することができる。

【0082】

(7) 2. 記載の蛋白質をアルツハイマー病患者の脳に投与することにより、神経細胞のアポトーシスを抑制し、アルツハイマー病の治療に利用することができる。また、この蛋白質を投与することにより細胞のアポトーシスを抑制することが期待できるので、アポトーシスの誘導が病態に関与している疾患の治療に利用することができる。

【0083】

本発明の蛋白質を有効成分として含む、アポトーシスに関与する疾患の治療薬は、通常は非経口的に全身又は局所的に投与することができる。非経口投与投与方法は、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができる。患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。その投与量は、年齢、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変えることができる。この場合、本発明の蛋白質の有効量と、適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得る担体との組成物として投与される有効量は、一回につき体重1kgあたり10 $\mu$ g～10mgの範囲で選ばれる。

【0084】

本発明の蛋白質を非経口投与する場合に適用される投与形態として、例えば安定剤、緩衝剤、保存剤、等張化剤等の添加剤を含有し、通常、単位投与量アンプル又は多投与量容器によるものが挙げられる。

さらに、本発明の蛋白質を有効成分として含むアポトーシスに関与する疾患の

であってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤形に応じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択されるが、これらに限定されるものではない。

【0085】

本発明の蛋白質を投与する適用となる疾患、すなわち、アポトーシスの誘導が病態に関与している疾患として、進行性の神経変性疾患例えばパーキンソン病 [ジャーナル・オブ・ニューロロジカル・サイエンス (Journal of Neurological Sciences), 137, 120 (1996)] や筋萎縮性側索硬化症 [ニューロパソロジー・アンド・アプライド・ニューロバイオロジー (Neuropathology and Applied Neurobiology), 21, 498 (1995)]、ハンチントン舞踏病 [Experimental Neurology, 133, 265 (1995)、ニューロリポート (Neuroreport), 6, 1053 (1995)、ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス (Journal of Neuroscience), 15, 3775 (1995)]、網膜色素変性症 [Neuron, 11, 595 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 974 (1994)]、緑内障 [インベスティゲイティブ・オブサルモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス (Investigative Ophthalmology & Visual Science), 36, 774 (1995)、ジャーナル・オブ・グローコーマ (Journal of Glaucoma), 5, 345, (1996)] アルコール性肝炎 [ジャーナル・オブ・ヘパトロジー (Journal of Hepatology), 6, 137, (1988)、ジャーナル・オブ・パソロジー (Journal of Pathology), 171, 73 (1993)] などがあげられる。

【0086】

(8) 2. 記載の蛋白質を抗原として用い、3. 記載の方法により抗体を製造



(9) 3. 記載の抗体を用いて、ヒトN a p 1蛋白質を検出することができる。

具体的にはマイクロタイタープレートを用いるE L I S A法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法等を用いた検出法をあげることができる。

【0087】

(10) 3. 記載の抗体を用いて、被験者脳組織に対する免疫組織染色に利用できる。

(11) 健常者の脳組織および被験者の脳組織由来のヒトN a p 1蛋白質を、3. 記載の抗体を用いて検出し、両者の脳における該蛋白質の量を測定して比較し、その量の低下を調べることにより、被験者におけるアルツハイマー病の診断を行うことができる。

【0088】

(12) 3. 記載の抗体を投与することにより、細胞のヒトN a p 1の活性を抑制し、アポトーシスを誘導することが期待できるので、アポトーシスの抑制が病態に関与している疾患の治療に利用することができる。

抗体の投与量、投与形態については、前記と同様である。

アポトーシスの関与している疾患として、例えばガン、あるいは全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、多発性硬化症等の自己免疫疾患等をあげることができる。

【0089】

#### 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例にその技術的範囲を限定するものではない。

#### 実施例1 ヒトN a p 1遺伝子のcDNA断片のクローン化

##### (1) 脳からの全RNAの取得

散発性アルツハイマー病の患者10名、アルツハイマー病でない人3名の大脳皮質から全RNAをトリゾル試薬(ライフ・テクノロジーズ社製)を用いて取得した。具体的な方法は試薬の説明書の指示に従った。このRNAをリボヌクレア

コンタミしているDNAを除去した後、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、ジエチルピロカーボネート (diethyl pyrocarbonate; DEPC) 処理した蒸留水に溶解した。

【0090】

(2) 全RNAを用いたディファレンシャル・ディスプレイ

伊藤らの方法 [FEBS Letters, 351, 231 (1994)] によりディファレンシャル・ディスプレイを行った。すなわち、(1) で取得したそれぞれのRNA 2.5  $\mu$ gと配列番号4から6に示す3種類のうちの1種類のアンカープライマー50 pmolを混ぜ、全体が10  $\mu$ lになるようにDEPC処理した蒸留水を添加し、70℃で10分間加熱後、すぐ氷水に漬けて急冷した。ここに、200単位の逆転写酵素スーパースクリプト・ツー・リボヌクレアーゼエッチマイナス・リバーストランスクリプターゼ (SUPERScript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase; ライフ・テクノロジーズ社製) を含む2×逆転写酵素反応用緩衝液 [40 mM Tris (Tris) -HCl (pH 8.4)、100 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM ジチオスレイトール (DTT) 2  $\mu$ l、0.2 mg/mlウシ血清アルブミン (BSA)、1 mM dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)] 10  $\mu$ lを添加して混合し、25℃で10分間、42℃で50分間反応させてcDNAを合成し、90℃で5分間加熱して反応を停止させた。この反応液にTE緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA] 80  $\mu$ lを添加し5倍に希釈した。

【0091】

合成した各々のcDNA 2  $\mu$ lに10×PCR用緩衝液 [100 mM Tris-HCl (pH 8.8)、500 mM KCl、15 mM MgCl<sub>2</sub>、1% トライトン (Triton) X-100、1 mM dNTP] 2  $\mu$ l、5 pmolアンカープライマー (cDNA合成時と同じ種類のもの)、10 pmol任意プライマー (配列番号7~16に示した10種類のうちの1種類)、DNAポリメラーゼGene Taq (ニッポンジーン社製) 1単位を添加し、蒸留水によって全体を20  $\mu$ lにしたものを、PCR用装置GeneAmp PCR System 9600 (パーキンエルマー社製) にセットした。

PCRの反応条件は、94℃で2分間、37℃で2分間、72℃で2分間反応させた後、94℃で30秒間、55℃で1分間、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとして25サイクル反応を行い、最後に72℃で5分間反応させた。アンカープライマーとして3種類、任意プライマーとして10種類使用したため、計30組の試料について反応を行った。

## 【0093】

各々のPCR反応後の液2μlにホルムアミド色素溶液（98%ホルムアミド、0.01%メチルバイオレット、10mM EDTA）2μlを添加し、90℃で2分間加熱後、氷冷した。トリス-グリシン緩衝液を用いて6%アクリルアミドゲル（幅20cm×高さ33cm×厚さ0.35mm）で20mAで2時間、電気泳動を行った。0.01%サイバーグリーンI [SYBR Green I; モレキュラー・プローブ (Molecular Probe) 社製] でDNAを蛍光染色後、フルオロイメージャー575 [モレキュラー・ダイナミックス (Molecular Dynamics) 社製] を用いて、PCRで増幅した断片約1200個を検出、比較した。このうちアルツハイマー病でない人3例に比較して散発性アルツハイマー病患者の脳10例で共通して顕著に減少した1個のバンドを選択した。このバンドを含んでいたPCRは、アンカープライマーとして配列番号4のもの、任意プライマーとして配列番号7のものを使用した反応であった。

## 【0094】

## (3) 選択した増幅断片バンドのクローン化

選択したバンドを含むゲル全体の画像を実物大にプリントアウトし、これとゲルを正確に重ねて、選択したバンドをゲルから切り出した。残ったゲルをフルオロイメージャーでスキャンすることにより、バンドが切り出されたことを確認した。切り出したゲルをPCR反応液 [アンカープライマー（配列番号4）、任意プライマー（配列番号7）を含む1×PCR用緩衝液] の50μl中に加え、DNAポリメラーゼGene Taq1単位を添加し、PCRを行うことにより、ゲルに含まれる断片をさらに増幅させた。PCRの反応条件は、94℃で30秒間、55℃で1分間、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとして30サイクル

解させた。

【0095】

増幅断片  $1\ \mu\text{l}$  と PCR 断片クローニング用ベクター pT7Blue T-Vector (ノバジェン社製; プラスミド pT7Blue の EcoR V サイトを切断し、両鎖の 3' 末端に dT を 1 個付加してあるベクター)  $1\ \mu\text{l}$  を混合し、DNA ライゲーションキット Ver. 2 (宝酒造社製) を用いて、キットの指示に従い、プラスミドに増幅断片を組み込んだ。大腸菌 DH5 $\alpha$  (ライフ・テクノロジーズ社製) を形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。該形質転換株コロニーを、滅菌した楊子で突ついて PCR 反応液  $25\ \mu\text{l}$  に懸濁させ、DNA ポリメラーゼ Gene Taq1 単位を添加し、増幅断片の再増幅と同じ条件で PCR を行った。この反応液  $2\ \mu\text{l}$  と、(2) でこの増幅断片を得たときの PCR の反応液  $2\ \mu\text{l}$  について、(2) のディファレンシャル・ディスプレイと同様の電気泳動と蛍光染色を同じゲル上に並べて行い、フルオロイメジャーで増幅断片を検出した。コロニーを鋳型にした PCR で、(2) の PCR 反応液で見られる選択したバンドと全く同じ位置に断片が増幅することから、該形質転換株には選択したバンドの DNA が含まれると判断した。

この形質転換体をクローン 9-1 とし、該クローン 9-1 よりプラスミド p9-1 を単離した。

【0096】

(4) 増幅断片の塩基配列の決定

p9-1 に含まれる増幅断片の塩基配列を決定した。塩基配列決定はシーキサム・ロング・リード・サイクル・シーケンス・キット [SequiTherm Long-Read Cycle Sequencing Kit; エピセンター・テクノロジーズ (Epicentre Technologies) 社製] を用いて反応を行い、ALF DNA シークエンサー (ファルマシア社製) を用いて決定した。反応の試薬と方法はキットの指示に従った。得られた塩基配列を配列番号 3 に示したが、塩基配列は 265 ヌクレオチドであり、配列番号 1 の塩基配列 3986 ~ 4236 番目に相当した。なお、配列番号 3 の 1-15 番目の配列は任意プライマー (配列番号 7) 由来の配列であり、241-265 番目の配列はアンカープライマー (配列番号 4) 由来の配列であるため、配

配列とは対応していない。

【0097】

実施例2 クローン9-1遺伝子のRT-PCRによる発現の特異性の確認

実施例1で単離した散発性アルツハイマー病患者10例およびアルツハイマー病でない人3例の脳皮質の全RNAに加え、さらにアルツハイマー病でない人7例の脳皮質から、実施例1(1)と同様にして全RNAを単離した。これらの全RNA 1  $\mu$ gに対して、逆転写酵素SUPERSCRIPT II RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptaseとランダムヘキサマープライマー(ライフ・テクノロジーズ社製)とを用いて、一本鎖cDNAを合成した。具体的試薬と方法はライフ・テクノロジーズ社の説明書の指示に従った。

【0098】

このcDNAを用いてRT-PCRを行うことにより、クローン9-1の遺伝子の脳皮質でのmRNAの発現量を、アルツハイマー病患者とアルツハイマー病でない人とで比較した。すなわち、反応後の溶液2  $\mu$ lを用いて1×PCR用緩衝液中で、5'側センスプライマー(配列番号17) 10 pmol、3'側アンチセンスプライマー(配列番号18) 10 pmol、DNAポリメラーゼGene Taq1単位を添加し、PCRを行った。PCRの反応条件は94℃で3分間加熱した後、94℃で30秒間、55℃で1分間、72℃で2分間からなる工程を1サイクルとして28サイクル反応を行い、最後に72℃で5分間反応させた。

【0099】

1%アガロースゲル電気泳動後、ゲルを0.01%サイバーグリーンIで染色し、増幅断片のバンド(配列番号3の27-211番目、配列番号1の4005-4189番目の塩基配列に相当)を検出した。

その結果、図1に示す結果が得られた。

図1は、クローン9-1のcDNA(=ヒトNap-1遺伝子のcDNA)についての、アルツハイマー病患者とアルツハイマー病でない人のそれぞれの脳皮質RNAを用いたRT-PCRの結果を示す図である。レーンのAD1~10はアルツハイマー病患者の脳皮質RNA、normal1~10はアルツハイマー病

ライマー、ef1 $\alpha$ はコントロールとして用いた伸長因子1 $\alpha$ 遺伝子特異的なプライマーをそれぞれ用いた結果を示す。

【0100】

図1の結果より、散发性アルツハイマー病患者10例全てで、コントロールのアルツハイマー病でない人10例と比較して、増幅断片の量が低下していることから、アルツハイマー病患者の大脳皮質ではクローン9-1の遺伝子のmRNAの発現量が低下していることが確認された。

なお、mRNAの量自身に変化がないことは、ハウスキーピング遺伝子である伸長因子1 $\alpha$  (ef1 $\alpha$ ) 遺伝子について、配列番号19および20に示したef1 $\alpha$ 特異的プライマーを用いて同様のRT-PCRを行うことによって確認した。ただし、PCRの反応条件は94℃で3分間加熱した後、94℃で30秒間、58℃で1分間、72℃で2分間からなる工程を1サイクルとして25サイクル反応を行い、最後に72℃で5分間反応させた。

【0101】

実施例3 クローン9-1の全長cDNAのクローン化

(1) cDNAライブラリーからのcDNAクローンの取得

ヒト大脳皮質cDNAライブラリー(クローンテック社製)からブラックハイブリダイゼーションにより、cDNAクローンの取得を行った。2 $\times$ 10<sup>5</sup>ブラックをプロットしたナイロンメンブレンフィルター[ハイボンドN<sup>+</sup>(Hybond N<sup>+</sup>); アマシャム社製]について、ハイブリダイゼーション溶液[6 $\times$ SSC、10 $\times$ デンハルト溶液(0.2% BSA、0.2%フィコール、0.2%ポリビニルピロリドン)、1% (w/v) SDS、200  $\mu$ g/mlの超音波処理後変性(沸騰水中で5分加熱後氷中で急冷した)させたサケ精子DNA]中にフィルターを密封し、60℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行った。

【0102】

プローブの作製は以下のように行った。すなわちクローン9-1のプラスミドDNAを鋳型にして、配列番号21および18のプライマーを用いて、実施例1と同様にして1 $\times$ PCR反応用緩衝液中でPCRを行い、配列番号3の26番め

20秒、58℃で30秒、72℃で1分からなる工程を1サイクルとして30サイクルの反応を行った。

【0103】

反応後の液を6%アクリルアミドゲルで電気泳動し、増幅断片のバンドをゲルから切り出して、この切り出したゲルを鋳型にして再度同じ条件でPCRを行い断片の再増幅を行った。反応液をエタノール沈殿した後、10 $\mu$ lの蒸留水に溶解させた。この溶液1 $\mu$ lに10 $\times$ 緩衝液[100mM Tris-HCl (pH8.8)、500mM KCl、1%トライトンX-100] 5 $\mu$ l、25mM MgCl<sub>2</sub>

5 $\mu$ l、10pmolプライマー（配列番号22および23）各1 $\mu$ l、4mM (dATP、dGTP、dTTP) 1 $\mu$ l、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (NEN社製) 10 $\mu$ l、Gene Taq 1 $\mu$ l添加し、再度同じ条件でPCRを行い、<sup>32</sup>P標識プローブを作製した。

【0104】

反応液からクイックスピンカラムG-50 (DNA) [ベーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim) 社製] を用いて、プローブを精製した。このプローブをハイブリダイゼーション溶液に添加してフィルターを密封し、60℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを0.2% (w/v) SDSを含む0.2 $\times$ SSCで60℃で30分間洗浄した後、イメージングプレート（富士写真フイルム社製）を感光させ、バイオイメージングアナライザーBAS2000A（富士写真フイルム社製）を用いてポジティブプラークを検出し、単離した。このcDNAライブラリーはベクターに $\lambda$  ZAP IIを用いているものであるため、単離したポジティブプラークを用いてイン・ビボ・エクシジョン (in vivo excision) を行い、ベクター部分を $\lambda$  ZAP IIからプラスミドpBluescript IIに変換したcDNAクローンp9-1-6を含有する大腸菌形質転換株 (Escherichia coli SOLR/p9-1-6) を得た。イン・ビボ・エクシジョンの具体的方法は、ストラタジーン社の説明書に従った。

【0105】

なお、p9-1-6を含有する大腸菌形質転換株Escherichia coli SOLR/p9-1-6は

生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に国際寄託されている。

(2) p9-1-6の含むcDNAの塩基配列の解析

p9-1-6のcDNAの塩基配列を実施例1(4)と同様にして決定を行った。その結果、配列番号1の166-4236番目に当たる4071bpの塩基配列は決定できたが、これよりも5'末側の塩基配列は決定できなかった。

【0106】

(3) 5'-RACEによるcDNAクロンの取得

cDNA全体の塩基配列を明らかにするため、5'-RACEを行った。ヒト脳ポリ(A)<sup>+</sup>RNA（クローンテック社製）について、配列番号22に示したcDNA特異的プライマーと5'-RACEキットであるライフ・テクノロジー社の5'-RACEシステムを用いることにより、プライマーの配列に対応するcDNAの部分（配列番号1の314-338番めの塩基配列に相当する）より5'側のcDNAを含むと考えられる約0.3kbのDNA断片を増幅した。

【0107】

5'-RACEの具体的方法はキットの説明書の指示に従った。このDNA断片を実施例1(3)と同様にして、ベクターpT7Blue T-Vectorにクローン化し、pRCOMを得た。

pRCOMを含有する大腸菌形質転換株*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pRCOMは、FERM BP-6202として、平成9年12月10日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託されている。

(4) cDNAの塩基配列の決定

5'-RACEで得られたクローンpRCOMのcDNAの塩基配列を、実施例1(5)と同様にして決定し、この塩基配列と実施例4(2)で決定したp9-1-6のcDNAの塩基配列とつなぎ合わせることにより、9-1の全長cDNAと考えられる塩基配列が得られた。この塩基配列は4236bpからなり、その中に1128アミノ酸からなるオープンリーディングフレーム(ORF)が存在した。このアミノ酸配列を配列番号2に示した。



この塩基配列を、相同性検索用プログラムBLASTを用いて塩基配列データベースGenBankと比較したところ、該塩基配列と一致する塩基配列はESTではいくつか、例えばアクセス番号AA307472、R58000、N44074のもの等が見出されたが、既存の塩基配列ではなく、新規な塩基配列であった。なお、一致が見られたESTは、すべてORFの途中から一致したものであったため、非完全長であるcDNAの塩基配列と考えられた。また、既存の塩基配列で最も高い相同性を示したのはラットのNap1の遺伝子であった。

#### 【0109】

結果を図2に示す。図2は、ヒトNap-1とラットNap-1のアミノ酸配列の比較を示した図である。humanにヒトNap-1、ratにラットNap-1のアミノ酸配列を1文字表記で示した。ただし、ラットNap-1ではヒトと同一のアミノ酸の場合は\*で示し、異なるアミノ酸についてのみ表記した。右端の数字はアミノ酸数を示す。

#### 【0110】

図2に示すように、ORFのアミノ酸配列ではラットNap1のORFと99.2%の相同性を持っており、そのアミノ酸数も1128で全く同じであった。したがって、このcDNAはヒトでのNap1遺伝子のcDNAと考えられた。

#### 実施例4 ヒトNap1遺伝子の染色体位置の決定

ヒトNap1遺伝子の染色体上の位置を、ヒトとげっし類とのハイブリッド体細胞パネル[バイオス・ラボラトリーズ(BIOS Laboratories)社製]を用いてRuddleらの方法[アニュアル・レビュー・オブ・ジェネティクス(Annual Review of Genetics), 9, 407 (1975)]により決定した。

#### 【0111】

すなわち、ヒトの各染色体に対応するそれぞれのハイブリッド細胞からゲノムDNAを精製し、その各染色体DNA100ngに対して、ヒトNap1遺伝子の塩基配列のうち、ヒトとラットのNap1遺伝子間で保存されていない3'側の領域(配列番号1の塩基配列の3837-4189番目に相当する。)を増幅させるセンスプライマー(配列番号23)およびアンチセンスプライマー(配列番

った。

【0112】

PCRの条件はまず94℃で1分間反応させ、94℃で1分間、61℃で1分間、72℃で1分30秒間からなる工程を1サイクルとして30サイクル反応させた後、72℃で5分間反応させた。その結果、ヒト2番染色体を含むDNAでのみ増幅がみられ、ヒトNap1遺伝子は2番染色体に存在すると考えられた。

Nap1遺伝子の染色体上の位置をより詳しく決定するため、蛍光イン・サイチュ・ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization; FISH) を文献 [ゲノミクス (Genomics), 17, 153 (1993)] に基づいて行った。すなわち、健常人男性のリンパ球から、チミジン同調法によりヒトのメタフェーズの染色体を調製し、プロモデオキシウリジン放出法によりRバンド染色標本を作成した。ハイブリダイゼーション前に染色体をヘキスト33258によって染色し、紫外線照射を行った。hNAP1のcDNA約4.2kbをビオチン-16- $\alpha$ -UTPを用いたニックトランスレーションによってビオチン標識してプローブとした。ハイブリダイゼーション溶液 [50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸 [シグマ (Sigma) 社製]、2×SSC、2  $\mu$ g/ $\mu$ lの超音波処理後変性サケ精子DNA、2  $\mu$ g/ $\mu$ l大腸菌tRNA] にビオチン標識プローブを終濃度25ng/ $\mu$ lになるように添加して、変性染色体標本とハイブリダイズさせた。

【0113】

文献 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2934 (1986)] の方法に従い、FITC標識アビジン (ベーリンガー・マンハイム社製) と反応させ、蛍光を増幅するため、さらにビオチン標識抗アビジンD [ベクター (Vector) 社製] と反応させた後、再度FITC標識アビジンを反応させ、ハイブリダイズした部位を検出した。染色体は1  $\mu$ g/ $\mu$ lヨウ化プロピジウムを用いて染色した。

その結果、本発明の遺伝子が存在する染色体上の位置は、2番染色体の長腕q32であり、2q32.1-2q32.2に存在することがわかった。

【0114】

実施例5 ヒトNap1 mRNAの各組織での発現の検出

(1) ヒト各組織でのNap1遺伝子の発現の検出

ヒトの各組織におけるNap1遺伝子のmRNAの発現を調べるために、クローンテック社のヒトの各組織のmRNAをブロッティングしたフィルターMTN・ブロット [MTN (Multiple Tissue Northern) Blot] を用いて、ノーザンブロットによりヒト各組織中のNap1のmRNAの発現を検出した。用いた、ヒト・MTN・ブロットには、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および脾臓のmRNAが、ヒト・MTN・ブロットIIには、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸および末梢白血球のmRNAが、ヒト脳・MTN・ブロットIIIには小脳扁桃、尾状核、脳梁、海馬、視床下部（全脳）、黒質、視床腹側部（視床下部核）、視床のmRNAがそれぞれ2  $\mu$ gずつブロッティングされている。

## 【0115】

実施例1で得たクローン9-1のcDNA断片をプローブとして使用するため、該cDNA断片を $[\alpha-^{32}\text{P}]$  dCTPおよびプライム-イットIIラベリングキット (Prime-It II labeling kit; ストラタジーン社製) を用いて $^{32}\text{P}$  標識した。標識の具体的試薬および方法はキットの指示に従った。

ハイブリダイゼーション液 [6×SSC、10×デンハルト溶液、1% SDS、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の超音波処理した後変性（沸騰水中で5分加熱後氷中で急冷した）させたサケ精子DNA] にフィルターを浸して密封し、60℃で2時間プレハイブリダイゼーションをした。次にプローブを沸騰水中で5分加熱後氷中で急冷して変性させ、ハイブリダイゼーション液に添加して、フィルターを浸して密閉し、60℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを取り出し、0.2% SDSを含む0.2×SSC中で60℃で30分間振とうして洗浄した。フィルターをイメージングプレート（富士フィルム社製）と重ねてオートラジオグラフィーを行い、バイオイメージングアナライザーBAS2000A（富士フィルム社製）で解析した。

## 【0116】

結果を図3に示す。図3において、各バンドは、左から、小脳扁桃、尾状核、脳梁、海馬、視床下部（全脳）、黒質、視床腹側部（視床下部核）、視床、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢白血球、心臓、脳、胎盤、肺、

p-1のmRNAの位置を表わす。各バンドの下に示されたef1 $\alpha$ は、コントロールとして行った伸長因子1 $\alpha$ 遺伝子のノーザンブロットの結果である。

【0117】

図3に示すように、ヒトNap1遺伝子は、末梢白血球を除くすべての組織において4.2kbの長さのmRNAに相当するバンドが検出された。したがってヒトNap1遺伝子は各組織で普遍的に発現している遺伝子であることがわかった。組織の中では脳、心臓、骨格筋で高い発現が見られた。また、脳の各組織においてもすべての組織で普遍的に発現していた。

(2) ヒト神経系細胞株でのNap1遺伝子のRT-PCR

脳では神経細胞とグリア細胞のどちらで主に発現が見られるのかを、細胞株のRT-PCRにより調べた。神経芽細胞腫株であるSH-SY5Y [国立神経科学研究所 高坂新一博士から供与された、キャンサー・リサーチ (Cancer Research), 33, 2643 (1973)] およびLA-N-5 [九州大学 山田猛博士から供与された、Experimental Cell Research, 148, 21 (1983)] とグリア細胞腫株であるU-251 [九州大学 山田猛博士から供与された、ジャーナル・オブ・ニューロパソロジー・アンド・エクスペリメンタル・ニューロロジー (Journal of Neuropathology & Experimental Neurology), 40, 390 (1981)] それぞれを、10%ウシ胎児血清、100単位/mlペニシリン、100mg/mlストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地 [DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)] で、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中37℃で培養した。それぞれの細胞から全RNAを単離し、実施例2と同様にしてRT-PCRを行った。

【0118】

結果を図4に示す。図4において、左から示すSH-SY5Y、LA-N-5、U-251は前記各細胞であり、hNAP-1はヒトNap1遺伝子に特異的なプライマー、ef1 $\alpha$ はコントロールとして用いた伸長因子1 $\alpha$ 遺伝子特異的なプライマーをそれぞれ用いた結果を示す。

図4に示すように神経芽細胞腫株であるSH-SY5YおよびLA-N-5ではNap1遺伝子の発現が検出されたが、グリア細胞腫株であるU-251では

細胞よりも神経細胞で主に発現していると考えられた。

### (3) 脳でのヒトNap1遺伝子のイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション

本発明の遺伝子が脳（主に神経細胞）で発現していることを確認するため、ヒト脳組織に対してイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション (in situ hybridization) を行った。

#### 【0119】

試料とするヒト脳組織は、死後、脊髄、小脳、中脳、基底核、前頭部大脳皮質、海馬の各組織をホルマリンで固定し、パラフィン包埋したものを用いた。

まず、cDNAクローンを鋳型として、配列番号24および25のプライマーを用いて94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で2分間からなる工程を1サイクルとして30サイクルのPCRの反応を行い、配列番号1の314番めから1051番めに相当する部分を増幅させた。その後、増幅断片をベクターpBluscript SK(-) (ストラタジーン社製) のEcoRVサイトにクローニングした。

#### 【0120】

このプラスミドDNAを鋳型にしてRNA転写キット (RNA Transcription Kit; ストラタジーン社製) を用いて、反応液に [<sup>35</sup>S] UTP α Sを添加してイン・ビトロで転写を行うことにより、<sup>35</sup>S 標識一本鎖RNAプローブを作成した。この際、プラスミドを制限酵素EcoR I (ライフ・テクノロジーズ社製) で切断後T7 RNAポリメラーゼを用いることによりアンチセンスプローブを、Hind I II (ライフ・テクノロジーズ社製) で切断後、T3 RNAポリメラーゼを用いることによりセンスプローブを作製した。

#### 【0121】

反応の具体的試薬や方法はキット添付の指示に従った。イン・サイチュ・ハイブリダイゼーションは文献 [ニューロサイエンス・レターズ (Neuroscience Letters), 194, 205 (1995)] の方法を少し改変して行った。すなわち、パラフィン包埋した試料を8 μmの厚さに切って切片を作り、シランでコートしたスライドガラス上に乗せた。なお、これらの作業はリボヌクレアーゼが付着しないように行った。脱パラフィン処理後、切片を10 mM PBS中に浸した後、10 μg

水酢酸を含む0.1Mトリエタノールアミン中でさらに10分間浸した。約 $1 \times 10^6$ cpm分のRNAプローブを添加したハイブリダイゼーション溶液 $200 \mu\text{l}$ で、ホルムアミドペーパー上の切片を覆い、 $65^\circ\text{C}$ で18時間保温して、プローブとハイブリダイゼーションさせた。切片を $2 \times \text{SSC}$ 中で $65^\circ\text{C}$ で30分間洗浄した後、高ストリンジェント洗浄液(50%ホルムアミド、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.1M DTT)中で $65^\circ\text{C}$ で30分間洗浄した。切片を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリボヌクレアーゼA中で $37^\circ\text{C}$ で30分間処理した後、風乾させ、オートラジオグラフィ用フィルムb-max(アマシャム社製)と密着させて48時間感光させた。次に切片を取り出し、オートラジオグラフィ用乳剤[50%(w/v)NR-2(コニカ社製)蒸留水溶液]に浸してから風乾させ、 $4^\circ\text{C}$ で28日間感光させた。

#### 【0122】

その結果、センスプローブではほとんどシグナルが見られないのに対して、アンチセンスプローブでは神経細胞が密度高く詰まっている組織である小脳、海馬、扁桃で高い発現が見られた。一方グリア細胞が多く存在する白質では発現は非常に低かった。さらに顕微鏡レベルで調べると、小脳の顆粒細胞層、小脳のブルキンエ細胞、海馬の神経細胞、歯状回、扁桃様核、大脳皮質で高い発現がみられ、グリア細胞よりも、神経細胞で主に発現していることが確認された。また、このアンチセンスプローブは、固定後、パラフィン包埋した若い成体のラットの脳に対しても同様の検出を行うことができた。脳の固定は、ラットを麻酔した後、4%パラホルムアルデヒド/ $10 \text{ mM}$  リン酸緩衝液で灌流することにより行った。

#### 【0123】

実施例6 ヒトNap1遺伝子アンチセンスDNAによるアポトーシスの促進

##### (1) アンチセンスDNAによるSH-SY5Y細胞の細胞死の促進

神経芽細胞腫株SH-SY5Yは実施例5(2)と同様に培養した。配列番号26に示す塩基配列をもつヒトNap1アンチセンス・フォスフォロチオエート・オリゴデオキシヌクレオチド(PS-ODN)、及び対照用として配列番号2

（東京大学）

製)、それぞれリポフェクトアミン (LipofectAmine) 試薬 (ライフ・テクノロジーズ社製) 4  $\mu$ l と混合し、200  $\mu$ l の DMEM に添加して室温で 30 分間インキュベート後、800  $\mu$ l の DMEM を加え、PS-ODN の終濃度 4.5  $\mu$ M になるよう、SH-SY5Y 細胞の培地中に添加した。さらに 12 時間培養を続け、PS-ODN を SH-SY5Y 細胞に取り込ませた。培地を PS-ODN を含まないものに交換し、さらに培養を続けた。培地交換してから 48 時間後、アンチセンス PS-ODN を取り込ませた細胞の多くは細胞の形が丸く変化して培地中に浮き上がり、多数の死細胞が観察された。一方、対照用のセンス PS-ODN を取り込ませた細胞は全く変化が見られなかった。

#### 【0124】

#### (2) アンチセンス DNA による SH-SY5Y 細胞のアポトーシスの促進

(1) と同様にして、アンチセンス PS-ODN またはセンス PS-ODN を添加して細胞を 12 時間培養し、細胞に PS-ODN を取り込ませた。培地交換後、12 時間ごとに 60 時間まで、細胞を 1000 g で 5 分間遠心することにより回収した。細胞溶解用緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、0.3% トライトン X-100] を添加し、氷上で 30 分間静置することにより細胞を溶解させ、さらに 27000 g で 20 分間遠心することによりクロマチン画分 (沈殿) と DNA 断片画分 (上清) に分けた。

#### 【0125】

上清に 0.5 mg/ml の濃度でプロテイナーゼ K を添加し、50℃ で 1 時間反応させた。0.4 mg/ml の濃度になるようリボヌクレアーゼ A を添加し、さらに 50℃ で 1 時間反応させた。フェノールクロロホルム抽出を 2 回行い、エタノール沈殿を行い、DNA を精製した。この DNA を TE 緩衝液に溶解し、1.5% アガロースゲル電気泳動を行った。電気泳動の緩衝液には 40 mM Tris-酢酸、1 mM EDTA (pH 7.2) を用いた。電気泳動後、DNA をサイバーグリーン I で染色して、UV トランスイルミネーターによりバンドを検出した。

#### 【0126】

結果を図 5 に示す。図 5 A は、アンチセンス PS-ODN (配列番号 26) を

示した図である。左からDNAサイズマーカー： $\phi$ X174 DNA/Hae III切断 (m)、試薬およびPS-ODN無添加 (1)、アンチセンスPS-ODNを取り込ませ、培地交換後0時間 (2)、12時間 (3)、24時間 (4)、36時間 (5)、48時間 (6)、60時間 (7)、センスPS-ODN (配列番号27)を取り込ませ、培地交換後60時間 (8)、リポフェクトアミン試薬のみ添加し、培地交換後60時間 (9)のSH-SY5YのDNAを示す。

#### 【0127】

図5Bは、アンチセンスPS-ODN (配列番号26)を神経細胞株SH-SY5Yに取り込ませた後の、ヒトNap1遺伝子のRT-PCRの結果を示す図である。各レーンの細胞の培養条件は図5Aのものと同じである。hNAP-1は、ヒトNap1遺伝子に特異的なプライマー、ef1 $\alpha$ はコントロールとして用いた伸長因子1 $\alpha$ 遺伝子特異的なプライマーをそれぞれ用いた結果を示す。

#### 【0128】

図5に示すように、アンチセンスPS-ODNを取り込ませ、培地交換してから48時間後と60時間後の細胞の上清には、アポトーシスをおこした細胞に特徴的なDNAラダーが観察された。このDNAラダーは、センスPS-ODNあるいはリポフェクトアミン試薬のみを添加して60時間後の細胞では観察されなかった。また、アンチセンスPS-ODNを取り込ませた細胞を上記と同様に経時的に回収し、実施例2と同様にヒトNap1遺伝子に対するRT-PCRを行ったところ、アンチセンスPS-ODNを添加して細胞に取り込ませるため12時間培養した直後から、ヒトNap1遺伝子のmRNAの発現が低下していることが確認された (図5B)。

#### 【0129】

またNap1遺伝子の別の位置と対応する配列番号28に示すヒトNap1アンチセンスPS-ODN (東亜合成社製)と対照用の配列番号29に示すセンスPS-ODN (東亜合成社製)について、同様にリポフェクトアミン試薬を用いてSH-SY5Yに取り込ませ、培地交換後60時間後の細胞についてDNAを電気泳動し調べたところ、やはりアンチセンスPS-ODNを取り込ませた細胞



、センスPS-ODNではDNAラダーはみられなかった。

【0130】

したがって、アンチセンスPS-ODNを細胞に取り込ませることによりNap1遺伝子の発現量が低下し、SH-SY5Y細胞にアポトーシスが引き起こされたことがわかった。このことから、Nap1遺伝子は細胞のアポトーシスを抑制していると考えらる。

また、in situ末端標識アッセイ法 [ジャーナル・オブ・セルラー・バイオロジー (Journal of Cellular Biology), 119, 493 (1992)] によるアポトーシスの検出も行った。SH-SY5Yをカバーガラス上にまいて、実施例5(3)と同様の培地で48時間培養した。アンチセンスPS-ODN (配列番号26) あるいは対照用のセンスPS-ODN (配列番号27) を添加して12時間培養し、PS-ODNを取り込ませた後、培地をPS-ODNを含まないものに交換し、さらに24時間培養した。この細胞についてTACSインサイチュアポトーシス検出キット [TACS In situ Apoptosis Detection Kit; トレビジェン (Trevigen) 社製] を用いてアポトーシスの検出を行った。具体的な試薬と方法はキットの指示に従った。アポトーシスにより切断を受けたヌクレオソーム中のDNAの末端特異的にビオチン標識をし、パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと結合させ、パーオキシダーゼ発色試薬TBLを用いて反応させたところ、アンチセンスPS-ODNを取り込ませた細胞では、濃青色に発色しアポトーシスが検出されたが、対照用のセンスPS-ODNでは検出されなかった。

【0131】

(3) アンチセンスDNAによるLA-N-5細胞およびレチノイン酸処理SH-SY5Y細胞のアポトーシスの促進

SH-SY5Y細胞よりも分化が進んだ神経細胞でもNap1遺伝子のアンチセンスDNAがアポトーシスを引き起こすかどうかを調べた。すなわち、10  $\mu$ M オールトランスレチノイン酸 (RA) (シグマ社製) を添加して培養したSH-SY5Y細胞、およびSH-SY5Yよりやや分化が進んでいる細胞と考えられている神経芽細胞腫セルラインLA-N-5に対して、(2)と同様に、配列

SH-SY5Y細胞は、10  $\mu$ M RA処理により神経突起を伸ばしたり、増殖が止まったり、細胞膜が活動電位を発生する等の、成熟した神経細胞の性質をもつように分化するといわれている。

【0132】

10  $\mu$ M RA処理SH-SY5Y細胞およびLA-N-5細胞でも、アンチセンスPS-ODNを取り込ませた細胞では、アポトーシスをおこした細胞に特徴的なDNAラダーが観察され、センスDNAではDNAラダーは観察されなかった。したがって、より分化が進んだ神経細胞でもNap1遺伝子のアンチセンスDNAがアポトーシスを引き起こすことが確認された。

また(2)と同様にして、LA-N-5に対してin situ 末端標識アッセイ法によるアポトーシスの検出を行ったところ、同様にアンチセンスPS-ODNではアポトーシスが検出されたが、対照用のセンスPS-ODNでは検出されなかった。

【0133】

【発明の効果】

本発明により、ヒトNap1蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質の製造方法、該蛋白質を認識する抗体及び該蛋白質の用途が提供される。

本発明により得られる新規遺伝子を用いることによりアルツハイマー病の治療や診断が可能である。

【0134】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：4236

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

組織の種類：脳

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：20..3406

配列：

CGGCGGCACC AGCACCACC ATG TCG CGC TCA GTG CTG CAG CCC AGT CAG CAG	52
Met Ser Arg Ser Val Leu Gln Pro Ser Gln Gln	
1 5 10	
AAG CTG GCG GAG AAG CTC ACC ATC CTC AAC GAC CGG GGC GTC GGC ATG	100
Lys Leu Ala Glu Lys Leu Thr Ile Leu Asn Asp Arg Gly Val Gly Met	
15 20 25	
CTC ACC CGC CTC TAC AAC ATC AAG AAG GCA TGT GGA GAC CCC AAG GCA	148
Leu Thr Arg Leu Tyr Asn Ile Lys Lys Ala Cys Gly Asp Pro Lys Ala	
30 35 40	
AAA CCA TCC TAT CTT ATC GAC AAA AAC CTG GAA TCT GCT GTG AAA TTC	196
Lys Pro Ser Tyr Leu Ile Asp Lys Asn Leu Glu Ser Ala Val Lys Phe	
45 50 55	
ATA GTC AGA AAA TTC CCT GCT GTA GAA ACC CGC AAC AAC AAT CAA CAG	244
Ile Val Arg Lys Phe Pro Ala Val Glu Thr Arg Asn Asn Asn Gln Gln	
60 65 70 75	
CTT GCA CAA CTA CAG AAA GAA AAA TCA GAG ATT CTG AAA AAT CTG GCA	292
Leu Ala Gln Leu Gln Lys Glu Lys Ser Glu Ile Leu Lys Asn Leu Ala	
80 85 90	
TTA TAT TAC TTC ACA TTT GTA GAT GTT ATG GAA TTT AAG GAC CAT GTT	340
Leu Tyr Tyr Phe Thr Phe Val Asp Val Met Glu Phe Lys Asp His Val	
95 100 105	
TGT GAA TTG CTG AAT ACT ATT GAC GTT TGC CAA GTC TTC TTT GAT ATT	388
Cys Glu Leu Leu Asn Thr Ile Asp Val Cys Gln Val Phe Phe Asp Ile	

ACT GTA AAC TTT GAT TTA ACA AAG AAC TAC TTA GAT TTA ATT ATA ACC	436
Thr Val Asn Phe Asp Leu Thr Lys Asn Tyr Leu Asp Leu Ile Ile Thr	
125 130 135	
TAT ACA ACA CTA ATG ATA CTG CTG TCT CGA ATT GAA GAA AGG AAG GCA	484
Tyr Thr Thr Leu Met Ile Leu Leu Ser Arg Ile Glu Glu Arg Lys Ala	
140 145 150 155	
ATC ATT GGA TTA TAC AAC TAT GCC CAT GAA ATG ACT CAT GGA GCA AGT	532
Ile Ile Gly Leu Tyr Asn Tyr Ala His Glu Met Thr His Gly Ala Ser	
160 165 170	
GAC AGA GAA TAC CCA CGC CTT GGC CAG ATG ATT GTG GAT TAT GAA AAC	580
Asp Arg Glu Tyr Pro Arg Leu Gly Gln Met Ile Val Asp Tyr Glu Asn	
175 180 185	
CCT TTA AAG AAG ATG ATG GAA GAA TTT GTA CCC CAT AGC AAG TCT CTT	628
Pro Leu Lys Lys Met Met Glu Glu Phe Val Pro His Ser Lys Ser Leu	
190 195 200	
TCA GAT GCA CTA ATT TCT CTT CAA ATG GTA TAT CCT CGA AGG AAT CTT	676
Ser Asp Ala Leu Ile Ser Leu Gln Met Val Tyr Pro Arg Arg Asn Leu	
205 210 215	
TCA GCT GAC CAG TGG AGA AAT GCC CAG TTA TTG AGC CTC ATC AGT GCA	724
Ser Ala Asp Gln Trp Arg Asn Ala Gln Leu Leu Ser Leu Ile Ser Ala	
220 225 230 235	
CCT AGT ACA ATG CTT AAT CCA GCA CAG TCC GAC ACT ATG CCT TGT GAA	772
Pro Ser Thr Met Leu Asn Pro Ala Gln Ser Asp Thr Met Pro Cys Glu	
240 245 250	
TAC CTC TCT TTG GAT GCA ATG GAA AAG TGG ATT ATC TTT GGC TTT ATT	820
Tyr Leu Ser Leu Asp Ala Met Glu Lys Trp Ile Ile Phe Gly Phe Ile	
255 260 265	
TTG TGC CAT GGG ATC CTA AAT ACT GAC GCT ACA GCA CTG AAC CTT TGG	868

270	275	280	
AAA CTA GCT CTT CAA AGT AGC TCT TGC CTC TCT CTC TTT CGG GAT GAA			916
Lys Leu Ala Leu Gln Ser Ser Ser Cys Leu Ser Leu Phe Arg Asp Glu			
285	290	295	
GTT TTC CAC ATT CAC AAA GCT GCA GAA GAC TTA TTT GTA AAC ATA CGA			964
Val Phe His Ile His Lys Ala Ala Glu Asp Leu Phe Val Asn Ile Arg			
300	305	310	315
GGC TAT AAT AAA CGT ATT AAT GAC ATA AGA GAA TGC AAG GAG GCA GCC			1012
Gly Tyr Asn Lys Arg Ile Asn Asp Ile Arg Glu Cys Lys Glu Ala Ala			
320	325	330	
GTG TCA CAT GCT GGT TCA ATG CAC AGA GAA AGA CGC AAG TTT TTA AGA			1060
Val Ser His Ala Gly Ser Met His Arg Glu Arg Arg Lys Phe Leu Arg			
335	340	345	
TCT GCA CTG AAG GAA TTG GCT ACT GTC CTC TCT GAT CAA CCT GGA TTG			1108
Ser Ala Leu Lys Glu Leu Ala Thr Val Leu Ser Asp Gln Pro Gly Leu			
350	355	360	
CTA GGT CCC AAG GCA CTT TTT GTT TTT ATG GCA TTA TCC TTT GCC CGT			1156
Leu Gly Pro Lys Ala Leu Phe Val Phe Met Ala Leu Ser Phe Ala Arg			
365	370	375	
GAT GAA ATC ATC TGG CTA CTT CGT CAT GCA GAT AAC ATG CCA AAG AAG			1204
Asp Glu Ile Ile Trp Leu Leu Arg His Ala Asp Asn Met Pro Lys Lys			
380	385	390	395
AGT GCA GAC GAC TTT ATA GAT AAG CAC ATT GCT GAA TTA ATA TTT TAC			1252
Ser Ala Asp Asp Phe Ile Asp Lys His Ile Ala Glu Leu Ile Phe Tyr			
400	405	410	
ATG GAA GAA CTT AGA GCA CAT GTG AGG AAA TAC GGA CCT GTA ATG CAG			1300
Met Glu Glu Leu Arg Ala His Val Arg Lys Tyr Gly Pro Val Met Gln			
415	420	425	

Arg Tyr Tyr Val Gln Tyr Leu Ser Gly Phe Asp Ala Val Val Leu Asn  
430 435 440  
GAA CTC GTG CAG AAT CTT TCT GTT TGC CCT GAA GAT GAA TCA ATC ATC 1396  
Glu Leu Val Gln Asn Leu Ser Val Cys Pro Glu Asp Glu Ser Ile Ile  
445 450 455  
ATG TCC TCT TTT GTT AAC ACT ATG ACT TCC CTA AGT GTA AAA CAA GTT 1444  
Met Ser Ser Phe Val Asn Thr Met Thr Ser Leu Ser Val Lys Gln Val  
460 465 470 475  
GAA GAT GGG GAA GTA TTT GAT TTC AGA GGA ATG AGA TTA GAT TGG TTT 1492  
Glu Asp Gly Glu Val Phe Asp Phe Arg Gly Met Arg Leu Asp Trp Phe  
480 485 490  
AGG TTA CAG GCA TAT ACT AGT GTC TCA AAG GCT TCA CTT GGC CTT GCA 1540  
Arg Leu Gln Ala Tyr Thr Ser Val Ser Lys Ala Ser Leu Gly Leu Ala  
495 500 505  
GAT CAC AGA GAA CTT GGG AAG ATG ATG AAT ACA ATA ATT TTT CAT ACA 1588  
Asp His Arg Glu Leu Gly Lys Met Met Asn Thr Ile Ile Phe His Thr  
510 515 520  
AAA ATG GTA GAT TCC TTG GTG GAA ATG TTG GTG GAA ACA TCA GAT CTC 1636  
Lys Met Val Asp Ser Leu Val Glu Met Leu Val Glu Thr Ser Asp Leu  
525 530 535  
TCC ATA TTT TGT TTT TAT AGT CGT GCT TTT GAG AAG ATG TTT CAA CAG 1684  
Ser Ile Phe Cys Phe Tyr Ser Arg Ala Phe Glu Lys Met Phe Gln Gln  
540 545 550 555  
TGT TTG GAG TTA CCC TCT CAA TCA AGA TAC TCA ATT GCA TTT CCA CTA 1732  
Cys Leu Glu Leu Pro Ser Gln Ser Arg Tyr Ser Ile Ala Phe Pro Leu  
560 565 570  
CTT TGC ACT CAT TTT ATG AGT TGC ACG CAT GAA CTA TGT CCA GAA GAG 1780  
Leu Cys Thr His Phe Met Ser Cys Thr His Glu Leu Cys Pro Glu Glu

CGA CAT CAT ATT GGA GAT CGC AGT CTT TCC TTA TGT AAT ATG TTC CTA	1828
Arg His His Ile Gly Asp Arg Ser Leu Ser Leu Cys Asn Met Phe Leu	
590 595 600	
GAT GAA ATG GCC AAA CAA GCT CGA AAT CTC ATC ACT GAT ATT TGC ACA	1876
Asp Glu Met Ala Lys Gln Ala Arg Asn Leu Ile Thr Asp Ile Cys Thr	
605 610 615	
GAA CAG TGT ACC CTT AGT GAC CAG TTG CTA CCC AAG CAT TGT GCC AAA	1924
Glu Gln Cys Thr Leu Ser Asp Gln Leu Leu Pro Lys His Cys Ala Lys	
620 625 630 635	
ACT ATC AGT CAA GCA GTG AAT AAG AAA TCA AAA AAG CAG ACT GGT AAG	1972
Thr Ile Ser Gln Ala Val Asn Lys Lys Ser Lys Lys Gln Thr Gly Lys	
640 645 650	
AAA GGG GAA CCT GAA AGG GAG AAA CCA GGT GTT GAG AGC ATG AGG AAA	2020
Lys Gly Glu Pro Glu Arg Glu Lys Pro Gly Val Glu Ser Met Arg Lys	
655 660 665	
AAC AGG CTG GTT GTG ACC AAC CTT GAT AAA TTG CAC ACT GCA CTT TCT	2068
Asn Arg Leu Val Val Thr Asn Leu Asp Lys Leu His Thr Ala Leu Ser	
670 675 680	
GAG TTA TGC TTC TCT ATA AAT TAT GTA CCA AAC ATG GTG GTA TGG GAA	2116
Glu Leu Cys Phe Ser Ile Asn Tyr Val Pro Asn Met Val Val Trp Glu	
685 690 695	
CAT ACC TTT ACC CCA CGA GAA TAT TTG ACT TCT CAT CTG GAA ATA CGC	2164
His Thr Phe Thr Pro Arg Glu Tyr Leu Thr Ser His Leu Glu Ile Arg	
700 705 710 715	
TTT ACC AAG TCA ATT GTT GGG ATG ACT ATG TAT AAT CAA GCC ACA CAG	2212
Phe Thr Lys Ser Ile Val Gly Met Thr Met Tyr Asn Gln Ala Thr Gln	
720 725 730	
GAA ATT GCA AAA CCT TCA GAA CTT CTA ACA AGT GTA AGA GCA TAC ATG	2260

735	740	745	
ACC GTA CTC CAG TCA ATA GAA AAC TAT GTG CAG ATT GAT ATT ACA AGA			2308
Thr Val Leu Gln Ser Ile Glu Asn Tyr Val Gln Ile Asp Ile Thr Arg			
750	755	760	
GTA TTT AAT AAT GTG CTT CTT CAA CAA ACA CAA CAT TTA GAC AGT CAT			2356
Val Phe Asn Asn Val Leu Leu Gln Gln Thr Gln His Leu Asp Ser His			
765	770	775	
GGA GAG CCA ACC ATT ACA AGT CTA TAC ACA AAT TGG TAT TTG GAA ACT			2404
Gly Glu Pro Thr Ile Thr Ser Leu Tyr Thr Asn Trp Tyr Leu Glu Thr			
780	785	790	795
TTG TTA CGA CAA GTC AGC AAT GGC CAT ATA GCA TAT TTT CCT GCA ATG			2452
Leu Leu Arg Gln Val Ser Asn Gly His Ile Ala Tyr Phe Pro Ala Met			
800	805	810	
AAA GCG TTT GTG AAC TTA CCT ACA GAA AAT GAA TTA ACA TTC AAT GCA			2500
Lys Ala Phe Val Asn Leu Pro Thr Glu Asn Glu Leu Thr Phe Asn Ala			
815	820	825	
GAG GAA TAT TCT GAC ATA TCA GAA ATG AGG TCA TTA TCA GAA CTA CTA			2548
Glu Glu Tyr Ser Asp Ile Ser Glu Met Arg Ser Leu Ser Glu Leu Leu			
830	835	840	
GGC CCA TAT GGT ATG AAG TTT CTA AGT GAA AGC CTT ATG TGG CAT ATT			2596
Gly Pro Tyr Gly Met Lys Phe Leu Ser Glu Ser Leu Met Trp His Ile			
845	850	855	
TCA TCA CAA GTT GCT GAA CTT AAG AAA CTT GTG GTG GAG AAT GTT GAT			2644
Ser Ser Gln Val Ala Glu Leu Lys Lys Leu Val Val Glu Asn Val Asp			
860	865	870	875
GTG TTA ACA CAA ATG AGG ACC AGC TTT GAC AAA CCA GAC CAG ATG GCT			2692
Val Leu Thr Gln Met Arg Thr Ser Phe Asp Lys Pro Asp Gln Met Ala			
880	885	890	



Ala Leu Phe Lys Arg Leu Ser Ser Val Asp Ser Val Leu Lys Arg Met	
895 900 905	
ACA ATA ATT GGT GTA ATT TTA TCC TTC CGA TCA TTG GCA CAA GAA GCA	2788
Thr Ile Ile Gly Val Ile Leu Ser Phe Arg Ser Leu Ala Gln Glu Ala	
910 915 920	
CTT AGA GAT GTG TTA TCC TAC CAC ATT CCT TTT CTT GTA AGT TCA ATT	2836
Leu Arg Asp Val Leu Ser Tyr His Ile Pro Phe Leu Val Ser Ser Ile	
925 930 935	
GAA GAT TTT AAG GAT CAC ATT CCA AGG GAA ACT GAT ATG AAG GTT GCA	2884
Glu Asp Phe Lys Asp His Ile Pro Arg Glu Thr Asp Met Lys Val Ala	
940 945 950 955	
ATG AAT GTG TAT GAG TTA TCA TCA GCT GCC GGA TTA CCT TGT GAG ATT	2932
Met Asn Val Tyr Glu Leu Ser Ser Ala Ala Gly Leu Pro Cys Glu Ile	
960 965 970	
GAT CCT GCA TTG GTC GTA GCT CTT TCT TCA CAA AAA TCG GAA AAC ATT	2980
Asp Pro Ala Leu Val Val Ala Leu Ser Ser Gln Lys Ser Glu Asn Ile	
975 980 985	
AGT CCA GAA GAA GAG TAT AAA ATT GCC TGC CTT CTC ATG GTG TTT GTG	3028
Ser Pro Glu Glu Glu Tyr Lys Ile Ala Cys Leu Leu Met Val Phe Val	
990 995 1000	
GCA GTT TCT TTG CCA ACA CTG GCC AGT AAT GTG ATG TCT CAG TAC AGC	3076
-Ala Val Ser Leu Pro Thr Leu Ala Ser Asn Val Met Ser Gln Tyr Ser	
1005 1010 1015	
CCT GCT ATA GAA GGG CAT TGC AAC AAC ATA CAT TGC TTG GCC AAA GCC	3124
Pro Ala Ile Glu Gly His Cys Asn Asn Ile His Cys Leu Ala Lys Ala	
1020 1025 1030 1035	
ATC AAC CAG ATT GCT GCA GCT TTG TTT ACA ATT CAC AAA GGA AGC ATT	3172
Ile Asn Gln Ile Ala Ala Ala Leu Phe Thr Ile His Lys Gly Ser Ile	

GAA GAC CGT CTT AAA GAA TTT CTG GCG CTT GCA TCC TCC AGT CTA CTG 3220

Glu Asp Arg Leu Lys Glu Phe Leu Ala Leu Ala Ser Ser Ser Leu Leu

1055

1060

1065

AAA ATT GGC CAG GAG ACA GAT AAA ACT ACA ACA AGA AAT AGA GAA TCT 3268

Lys Ile Gly Gln Glu Thr Asp Lys Thr Thr Thr Arg Asn Arg Glu Ser

1070

1075

1080

GTT TAT TTA CTG CTA GAT ATG ATT GTA CAA GAA TCT CCA TTC CTT ACA 3316

Val Tyr Leu Leu Leu Asp Met Ile Val Gln Glu Ser Pro Phe Leu Thr

1085

1090

1095

ATG GAT CTT TTG GAA TCT TGT TTT CCT TAT GTC TTG CTG AGA AAT GCA 3364

Met Asp Leu Leu Glu Ser Cys Phe Pro Tyr Val Leu Leu Arg Asn Ala

1100

1105

1110

1115

TAC CAT GCT GTC TAC AAA CAA AGT GTT ACA TCT TCT GCA TAAAATTACC 3413

Tyr His Ala Val Tyr Lys Gln Ser Val Thr Ser Ser Ala

1120

1125

TACTTAATCA AGATAAGCAC GCATTTTTGT TGCCTTGGTT TTACCTGTAG ACTGTGGAAC 3473

TATTTTACCT TAAGACCTGA AAAAGTTTTG TGGATTATAA ATTTCTTTCA TACGGTTGTA 3533

TTTTCTGATC ATTGGTTTCT TAATATGGTT GTACTACAGT ATACTTGGTT GATTAGGTT 3593

GCACATTCAC TGAATTCACCT GAGATTATTC CTATAATTTT AAAGTATCAT TTATTTGAAA 3653

AACATACATT ATCAACATGT TTTTGATATT TGATAATGAA AAAAATCTTT GCTTGTTTAT 3713

TTCTGAAAAA GAACTGTATT TAGTGATTAT TTTAGATAGT GATATTATAG CATTATCTG 3773

TGTGTAAATT ATTCATATA GGGAAGAGTT CTGATCTGTA CCTATGGTTC TTATTGAAAA 3833

CAACATTGGA TGTGCATTTC TGTGATGTTA TGAATACATT TCTACTTTAT TTTGAAACAT 3893

TTGCCAAACT AAATACTGTA ACACTGTATA ACATTTAAAA ATGTTAAAGA ACTGCTTAGT 3953

ATTAGAAGCA GATCATTTCC CAAAATTCTA AGAGCAGCAG CATATGTTGT TGCTTGATA 4013

AAGCCTAGCG ATAATTTTGA GACTAACTTC CATGGTGCCC TGTTGGCATT AGCACTACCA 4073

TTGTACCCTG CTGTATAATA AACAATCTTA GACATTTATC AACTGTTGAT ACAAATGTTA 4133

GTCCCTAACCC ACTTTTTTATA TATGTTTTAA ATTTTGTAAA TTCAAGTGTA CCTTCCATAA 4193

【0135】

配列番号：2

配列の長さ：1128

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

組織の種類：脳

Met	Ser	Arg	Ser	Val	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln	Gln	Lys	Leu	Ala	Glu	Lys
1				5					10					15	
Leu	Thr	Ile	Leu	Asn	Asp	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Leu	Thr	Arg	Leu	Tyr
				20				25						30	
Asn	Ile	Lys	Lys	Ala	Cys	Gly	Asp	Pro	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Leu
				35				40						45	
Ile	Asp	Lys	Asn	Leu	Glu	Ser	Ala	Val	Lys	Phe	Ile	Val	Arg	Lys	Phe
				50				55						60	
Pro	Ala	Val	Glu	Thr	Arg	Asn	Asn	Asn	Gln	Gln	Leu	Ala	Gln	Leu	Gln
65						70					75				80
Lys	Glu	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Thr
				85						90				95	
Phe	Val	Asp	Val	Met	Glu	Phe	Lys	Asp	His	Val	Cys	Glu	Leu	Leu	Asn
				100				105						110	
Thr	Ile	Asp	Val	Cys	Gln	Val	Phe	Phe	Asp	Ile	Thr	Val	Asn	Phe	Asp
				115				120						125	
Leu	Thr	Lys	Asn	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ile	Ile	Thr	Tyr	Thr	Thr	Leu	Met
				130				135						140	
Ile	Leu	Leu	Ser	Arg	Ile	Glu	Glu	Arg	Lys	Ala	Ile	Ile	Gly	Leu	Tyr

Asn Tyr Ala His Glu Met Thr His Gly Ala Ser Asp Arg Glu Tyr Pro

165

170

175

Arg Leu Gly Gln Met Ile Val Asp Tyr Glu Asn Pro Leu Lys Lys Met

180

185

190

Met Glu Glu Phe Val Pro His Ser Lys Ser Leu Ala Asp Ala Leu Ile

195

200

205

Ser Leu Gln Met Val Tyr Pro Arg Arg Asn Leu Ser Ala Asp Gln Trp

210

215

220

Arg Asn Ala Gln Leu Leu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Ser Thr Met Leu

225

230

235

240

Asn Pro Ala Gln Ser Asp Thr Met Pro Cys Glu Tyr Leu Ser Leu Asp

245

250

255

Ala Met Glu Lys Trp Ile Ile Phe Gly Phe Ile Leu Cys His Gly Ile

260

265

270

Leu Asn Thr Asp Ala Thr Ala Leu Asn Leu Trp Lys Leu Ala Leu Gln

275

280

285

Ser Ser Ser Cys Leu Ser Leu Phe Arg Asp Glu Val Phe His Ile His

290

295

300

Lys Ala Ala Glu Asp Leu Phe Val Asn Ile Arg Gly Tyr Asn Lys Arg

305

310

315

320

Ile Asn Asp Ile Arg Glu Cys Lys Glu Ala Ala Val Ser His Ala Gly

325

330

335

Ser Met His Arg Glu Arg Arg Lys Phe Leu Arg Ser Ala Leu Lys Glu

340

345

350

Leu Ala Thr Val Leu Ser Asp Gln Pro Gly Leu Leu Gly Pro Lys Ala

355

360

365

Leu Phe Val Phe Met Ala Leu Ser Phe Ala Arg Asp Glu Ile Ile Trp

370

375

380

Ileu Ileu Arg His Ala Asn Asn Met Pro Iys Iys Ser Ala Asn Asn Phe

385	390	395	400
Ile Asp Lys His	Ile Ala Glu Leu	Ile Phe Tyr Met	Glu Glu Leu Arg
405	410	415	
Ala His Val Arg	Lys Tyr Gly Pro	Val Met Gln Arg	Tyr Tyr Val Gln
420	425	430	
Tyr Leu Ser Gly	Phe Asp Ala Val	Val Leu Asn Glu	Leu Val Gln Asn
435	440	445	
Leu Ser Val Cys	Pro Glu Asp Glu	Ser Ile Ile Met	Ser Ser Phe Val
450	455	460	
Asn Thr Met Thr	Ser Leu Ser Val	Lys Gln Val Glu	Asp Gly Glu Val
465	470	475	480
Phe Asp Phe Arg	Gly Met Arg Leu	Asp Trp Phe Arg	Leu Gln Ala Tyr
485	490	495	
Thr Ser Val Ser	Lys Ala Ser Leu	Gly Leu Ala Asp	His Arg Glu Leu
500	505	510	
Gly Lys Met Met	Asn Thr Ile Ile	Phe His Thr Lys	Met Val Asp Ser
515	520	525	
Leu Val Glu Met	Leu Val Glu Thr	Ser Asp Leu Ser	Ile Phe Cys Phe
530	535	540	
Tyr Ser Arg Ala	Phe Glu Lys Met	Phe Gln Gln Cys	Leu Glu Leu Pro
545	550	555	560
Ser Gln Ser Arg	Tyr Ser Ile Ala	Phe Pro Leu Leu	Cys Thr His Phe
565	570	575	
Met Ser Cys Thr	His Glu Leu Cys	Pro Glu Glu Arg	His His Ile Gly
580	585	590	
Asp Arg Ser Leu	Ser Leu Cys Asn	Met Phe Leu Asp	Glu Met Ala Lys
595	600	605	
Gln Ala Arg Asn	Leu Ile Thr Asp	Ile Cys Thr Glu	Gln Cys Thr Leu

Ser Asp Gln Leu Leu Pro Lys His Cys Ala Lys Thr Ile Ser Gln Ala  
625 630 635 640  
Val Asn Lys Lys Ser Lys Lys Gln Thr Gly Lys Lys Gly Glu Pro Glu  
645 650 655  
Arg Glu Lys Pro Gly Val Glu Ser Met Arg Lys Asn Arg Leu Val Val  
660 665 670  
Thr Asn Leu Asp Lys Leu His Thr Ala Leu Ser Glu Leu Cys Phe Ser  
675 680 685  
Ile Asn Tyr Val Pro Asn Met Val Val Trp Glu His Thr Phe Thr Pro  
690 695 700  
Arg Glu Tyr Leu Thr Ser His Leu Glu Ile Arg Phe Thr Lys Ser Ile  
705 710 715 720  
Val Gly Met Thr Met Tyr Asn Gln Ala Thr Gln Glu Ile Ala Lys Pro  
725 730 735  
Ser Glu Leu Leu Thr Ser Val Arg Ala Tyr Met Thr Val Leu Gln Ser  
740 745 750  
Ile Glu Asn Tyr Val Gln Ile Asp Ile Thr Arg Val Phe Asn Asn Val  
755 760 765  
Leu Leu Gln Gln Thr Gln His Leu Asp Ser His Gly Glu Pro Thr Ile  
770 775 780  
Thr Ser Leu Tyr Thr Asn Trp Tyr Leu Glu Thr Leu Leu Arg Gln Val  
785 790 795 800  
Ser Asn Gly His Ile Ala Tyr Phe Pro Ala Met Lys Ala Phe Val Asn  
805 810 815  
Leu Pro Thr Glu Asn Glu Leu Thr Phe Asn Ala Glu Glu Tyr Ser Asp  
820 825 830  
Ile Ser Glu Met Arg Ser Leu Ser Glu Leu Leu Gly Pro Tyr Gly Met  
835 840 845

850	855	860	
Glu Leu Lys Lys Leu Val Val Glu Asn Val Asp Val Leu Thr Gln Met			
865	870	875	880
Arg Thr Ser Phe Asp Lys Pro Asp Gln Met Ala Ala Leu Phe Lys Arg			
885	890	895	
Leu Ser Ser Val Asp Ser Val Leu Lys Arg Met Thr Ile Ile Gly Val			
900	905	910	
Ile Leu Ser Phe Arg Ser Leu Ala Gln Glu Ala Leu Arg Asp Val Leu			
915	920	925	
Ser Tyr His Ile Pro Phe Leu Val Ser Ser Ile Glu Asp Phe Lys Asp			
930	935	940	
His Ile Pro Arg Glu Thr Asp Met Lys Val Ala Met Asn Val Tyr Glu			
945	950	955	960
Leu Ser Ser Ala Ala Gly Leu Pro Cys Glu Ile Asp Pro Ala Leu Val			
965	970	975	
Val Ala Leu Ser Ser Gln Lys Ser Glu Asn Ile Ser Pro Glu Glu Glu			
980	985	990	
Tyr Lys Ile Ala Cys Leu Leu Met Val Phe Val Ala Val Ser Leu Pro			
995	1000	1005	
Thr Leu Ala Ser Asn Val Met Ser Gln Tyr Ser Pro Ala Ile Glu Gly			
1010	1015	1020	
His Cys Asn Asn Ile His Cys Leu Ala Lys Ala Ile Asn Gln Ile Ala			
1025	1030	1035	1040
Ala Ala Leu Phe Thr Ile His Lys Gly Ser Ile Glu Asp Arg Leu Lys			
1045	1050	1055	
Glu Phe Leu Ala Leu Ala Ser Ser Ser Leu Leu Lys Ile Gly Gln Glu			
1060	1065	1070	
Thr Asp Lys Thr Thr Thr Arg Asn Arg Glu Ser Val Tyr Leu Leu Leu			

Asp Met Ile Val Gln Glu Ser Pro Phe Leu Thr Met Asp Leu Leu Glu

1090

1095

1100

Ser Cys Phe Pro Tyr Val Leu Leu Arg Asn Ala Tyr His Ala Val Tyr

1105

1110

1115

1120

Lys Gln Ser Val Thr Ser Ser Ala

1125

【0136】

配列番号：3

配列の長さ：265

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

組織の種類：脳

CAGCAGCAGC AGCAGCATAT GTTGTGCTT GTATAAAGCC TAGCGATAAT TTTTAGACTA 60

ACTTCCATGG TGCCCTGTTG GCATTAGCAC TACCATTGTA CCCTGCTGTA TAATAAACAA 120

TCTTAGACAT TTATCAACTG TTGATACAAA TGTTAGTCCC TAACCACGTT TTATATATGT 180

TTTAAATTTT TGAAATTCAA GTGTACCTTC CATAACATAA AATAAACACT AGACTGTATC 240

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA

【0137】

配列番号：4

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

TTTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTT



【0138】

配列番号：5

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

TTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTA

16

【0139】

配列番号：6

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

TTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTC

16

【0140】

配列番号：7

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

CAGCAGCAGC AGCAG

15

【0141】

配列番号：8

配列の長さ：15

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

CTGCTGCTGC TGCTG

15

【0142】

配列番号：9

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

CGCAATTAAC CCTCACTAAAG

20

【0143】

配列番号：10

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

GCGTAATACG ACTCACTATA G

21

【0144】

配列番号：11

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

CCAGGTGGCG GACGTGTG

18

【0145】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

CTCCTGCCAA GAGCTCAT

18

【0146】

配列番号：13

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

TGCTGCTCTC CTCGACATG

19

【0147】

配列番号：14

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

GTCATTCCTC CAAGGTCAGC

20

【0148】

配列番号：15

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

CAGTATTCTA GGTAGTGCCC

20

【0149】

配列番号：16

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

AGCAGTGCCC TGAAGATTA

19

【0150】

配列番号：17

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

GCTTGTATAA AGCCTAGCG

19

【0151】

配列番号：18

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

GGAAGGTACA CTTGAATTTC

20

【0152】

配列番号：19

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

AGAAGGCTGC TGGAGCTGG

19

【0153】

配列番号：20

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

CTGTGACAAA TTTTGGTCA AG

22

【0154】

配列番号：21

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

TGCTTGATATA AAGCCTAGCG

20

【0155】

配列番号：22

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

CATGGTCCCT TAAATCCATA ACATC

25

【0156】

配列番号 : 23

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

CATTGGATGT GCATTCTGTG

20

【0157】

配列番号 : 24

配列の長さ : 19

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

GATGTTATGG ATTTAAGGG

19

【0158】

配列番号 : 25

配列の長さ : 19

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

CTTGCGTCTT TCTCTGTGC

19

【0159】

配列番号 : 26

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

AGCACTGAGC GCGACATGGT

20

【0160】

配列番号：27

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

ACCATGTCGC GCTCAGTGCT

20

【0161】

配列番号：28

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

TCCTTAAATT CCATAACATC

20

【0162】

配列番号：29

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

GATGTTATGG AATTTAAGGA

20

【図面の簡単な説明】

【図1】

【図2】

ヒトNap-1とラットNap-1のアミノ酸配列の比較を示した図である。

【図3】

ノーザンブロットによるヒトNap-1の各組織での発現分布を示す電気泳動写真である。

【図4】

ヒト神経系細胞株でのNap1遺伝子についてのRT-PCRの結果を示す電気泳動写真である。

【図5】

アンチセンスPS-ODNを神経細胞株SH-SY5Yに取り込ませた後の細胞のDNAの電気泳動の結果を示した写真である。



特平 9-363183

【書類名】 図面

【図1】

100mm

40

2 4 6 8 10 12 14 16 18 20

9-1

of 1a

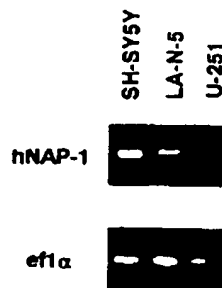
【圖 2】

[illegible]

【图3】



【图4】



【图5】

A

m 1 2 3 4 5 6 7 8 9



B

1 2 3 4 5 6 7 8 9

hNAP-1



ef1 $\alpha$



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒトNap1蛋白質及び該蛋白質をコードするDNAの提供。

【解決手段】 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または配列番号2で表わされるアミノ酸配列において、一個以上のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、アポトーシス抑制活性を有する蛋白質、及び前記蛋白質をコードするDNA。

【選択図】 なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000001029

【住所又は居所】

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

【氏名又は名称】

協和醗酵工業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】

597138830

【住所又は居所】

神奈川県横浜市金沢区釜利谷南2-51-42

【氏名又は名称】

榊 佳之

【代理人】

申請人

【識別番号】

100091096

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】

平木 祐輔

【代理人】

申請人

【識別番号】

100096183

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】

石井 貞次

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 H09-0551Q3

【提出日】 平成10年 1月23日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成 9年特許願第363183号

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 597138830

【氏名又は名称】 榊 佳之

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 委任状

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 委任状 2

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 受託証

【補正方法】 追加

特平 9-363183

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 受託証（写） 2



19801400104



## 委任状

平成 10 年 1 月 16 日

私は、識別番号<sup>100091096</sup><sub>100096183</sub>弁理士平 木 祐 輔 氏を以って

代理人として下記事項を委任します。

記

### 1. 特 許 出 願



に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2. 上記出願又は 平成 年 願 号

に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並びにその取下げ。

3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並びに本件に関する上記事項一切。

4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受けること。

5. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護商標）登録に対する登録異議の申立てに関する手続。

6. 第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。

7. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。

8. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。

住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号  
協和酸酵工業株式会社  
氏 名 取締役社長 平 田 正



## 委任状

平成 10 年 1 月 16 日

私は、識別番号 100091096 弁理士 平 木 祐 輔 氏を以って  
100096183 石 井 貞 次  
代理人として下記事項を委任します。

記

### 1. 特 許 出 願

に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2. 上記出願又は 平成 年 願 号

に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並びにその取下げ。

3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並びに本件に関する上記事項一切。

4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受けること。

5. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護商標）登録に対する登録異議の申立てに関する手続。

6. 第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。

7. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。

8. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。

住 所 神奈川県横浜市中区金沢  
2-51-42

氏 名 榑 佳之



特平 9-363183

国際様式 INTERNATIONAL FORM



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

協和発酵工業株式会社

取締役社長 半田 正

股

寄託者

あて名 〒 100

東京都千代田区大手町一丁目6番1号

19801400104



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli SOLR/p9-1-6	(受託番号) FERM BP- 6201
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 12 月 10 日 (原寄託日) に受領した1種の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に1種の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 名称: Agency for Industrial Science and Technology 所長 大橋 信 Dr. Shigeaki Ohashi Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 9 年 (1997) 12 月 10 日	

国際様式 INTERNATIONAL FORM



〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名 (名称) 協和発酵工業株式会社  
取締役社長 平田 正

寄託者 あて名 〒 100  
東京都千代田区大手町一丁目6番1号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli DH5α/pRCOM	(受託番号) FERM BP- 6202
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1個の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 12 月 10 日 (原寄託日) に受領した1個の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に1個の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 名称: Agency for Industrial Science and Technology 所長 大賀 賢 Dr. Shigenori Ohgaki Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken. 305, JAPAN 平成 9 年 (1997) 12 月 10 日	

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】 000001029

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【補正をする者】

【識別番号】 597138830

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区釜利谷南2-51-42

【氏名又は名称】 榊 佳之

【代理人】 申請人

【識別番号】 100091096

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

受託証（写） 1

特平 9-363183

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日	1990年 8月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名	協和醗酵工業株式会社

特平 9-363183

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597138830]

1. 変更年月日 1997年 9月12日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県横浜市金沢区釜利谷南2-51-42

氏 名 榊 佳之



PCT

特許協定条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 15/63, 5/10, C12P 21/02, 21/08, C07K 14/47, 16/18, A61K 38/17, 39/395, G01N 33/53</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/31239</p> <p>(43) 国際公開日 1999年6月24日(24.06.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05646</p> <p>(22) 国際出願日 1998年12月14日(14.12.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/363183 1997年12月15日(15.12.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 榊 佳之(SAKAKI, Yoshiyuki)[JP/JP] 〒236-0045 神奈川県横浜市金沢区釜利谷南2-51-42 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ニューラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: HUMAN Nap1 PROTEIN</p> <p>(54) 発明の名称 ヒトNap1蛋白質</p> <p>(57) Abstract A protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2; a protein having an amino acid sequence resulting from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 by substitution, deletion or addition of at least one amino acid and having an apoptosis inhibitory activity; and a DNA encoding the above proteins.</p>		





PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 15/63, 5/10, C12P 21/02, 21/08, C07K 14/47, 16/18, A61K 38/17, 39/395, G01N 33/53</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/31239</p> <p>(43) 国際公開日 1999年6月24日(24.06.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05646</p> <p>(22) 国際出願日 1998年12月14日(14.12.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/363183 1997年12月15日(15.12.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 榎 佳之(SAKAKI, Yoshiyuki)[JP/JP] 〒236-0045 神奈川県横浜市金沢区釜利谷南2-51-42 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: HUMAN Nap1 PROTEIN</p> <p>(54)発明の名称 ヒトNap1蛋白質</p> <p>(57) Abstract A protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2; a protein having an amino acid sequence resulting from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 by substitution, deletion or addition of at least one amino acid and having an apoptosis inhibitory activity; and a DNA encoding the above proteins.</p>		

## 明 細 書

## ヒトN a p l 蛋白質

## 技術分野

本発明は、ヒトN a p l 蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質の製造方法、該蛋白質を認識する抗体及び該蛋白質の用途に関する。

## 背景技術

アルツハイマー病は、進行性の脳神経変性疾患であり、老人性痴呆原因の一つである。アルツハイマー病には遺伝子の変異が原因と考えられる家族性のものと散発性のものがあるが、大部分は散発性である。その病理面での特徴は、家族性、散発性どちらも、神経細胞の脱落および大量死による脳の萎縮、神経細胞内の神経原繊維変化とよばれる変性、老人斑とよばれるアミロイド繊維の細胞間隙への沈着等があげられる。その発症に関与する因子について多くの研究がなされているが、これらの障害に至る生化学的な機構はあまり解明されていない。

家族性アルツハイマー病は、遺伝子変異が原因で発症すると考えられている。そして、家族性アルツハイマー病の遺伝子解析から、アルツハイマー病関連遺伝子として、 $\beta$ -アミロイド前駆体蛋白 [ネイチャー (Nature), 325, 733 (1987)]、プレセニリン (presenilin) 1 [Nature, 375, 754 (1995)]、プレセニリン 2 [サイエンス (Science), 269, 973 (1995)] が報告されている。また発症の危険因子と考えられる遺伝子として、アポリポ蛋白 E (apolipoprotein E; a p o E) の対立遺伝子多型のうちの 4 型が報告されている [Science, 261, 921 (1993)]。

正常細胞における実験において、 $\beta$ -アミロイド前駆体蛋白の変異型遺伝子を細胞に導入し発現させると、アポトーシスが誘導されたという報告 [Science, 272, 1349 (1996)]、 $\beta$ -アミロイド前駆体蛋白から生成する  $\beta$ -アミロイドペプチドを神経細胞に投与すると細胞死を誘導したという報告 [Science, 245, 417 (1989)]、 $\beta$ -アミロイドペプチドの一部分にあたるペプ

Res. Commun. 219, 509 (1996)]。

なお、ラット N a p 1 にホモロジーをもつ蛋白質として、ヒトの血球細胞に特異的に発現している遺伝子としてクローン化されたヒト H e m - 1 c D N A [バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ (Biochimica et Biophysica Acta), 1090, 241 (1991)]、卵細胞形成および初期胚発生に重要な役割を果たしていると考えられるショウジョウバエの遺伝子 d h e m - 2 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 251, 41 (1995)]、並びにラット脳 c D N A ライブラリーより H 1 9 c D N A をプローブにして得られたラット H e m - 2 c D N A [J. Mol. Biol., 251, 41 (1995)]におけるこれらの遺伝子の発現産物が知られている。それぞれの蛋白質とラット N a p 1 とのアミノ酸配列のホモロジーは、ヒト H e m - 1 が 5 9 %、ショウジョウバエ d h e m - 2 が 6 0 %、ラット H e m - 2 は 9 4 % という非常に高い値である。

N a p 1 が会合している N c k は、3 7 7 アミノ酸からなる細胞内蛋白質であり、S H 2 ドメインと 3 つの S H 3 ドメインを有している [ヌクレイック・アシッツ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 18, 1048 (1990)]。一般に、S H 2 ドメインはリン酸化チロシンを含むドメインと結合し、S H 3 ドメインはプロリンを多く含むドメインと結合する性質を有すると考えられており、これらのドメインをもつ分子は、細胞内情報伝達に関与していると考えられている。すなわち、多くの細胞増殖因子のリセプターは細胞内にチロシンキナーゼ活性をもつドメインをもっており、リガンドとの結合によりそのチロシンキナーゼが活性化され、自己又は他の分子のチロシン残基をリン酸化することで情報伝達を開始されることが考えられている。例えば、N c k は、その S H 2 ドメインを介して、上皮増殖因子 (Epidermal Growth Factor; E G F)、血小板由来増殖因子 (Platelet derived growth factor; P D G F)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; V E G F)、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; H G F) 等の細胞増殖因子のチロシンキナーゼ型リセプターの自己リン酸化チロシンと結合し、リン酸化を受けることが報告されている [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8894 (1992)、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Molecular & Cellular Biology), 12, 5824 (1992)、ジャーナル・オ

Sequence Tag ; c D N Aライブラリー中の多数の c D N A クローンの 3' 端および 5' 端の塩基配列情報を重複を含めて集めたもの) としてラット H e m - 2 あるいはマウス H 1 9 とホモロジーのあるヒト c D N A クローンの 5' 端部分の塩基配列のいくつかについて、塩基配列データベース GenBank 中に報告されているだけであり、その全体の構造については不明である。

そこで、アルツハイマー病の診断、予防、治療のために、アルツハイマー病に関連する遺伝子等の解明が望まれている。

### 発明の開示

本発明は、ヒト N a p 1 蛋白質、該蛋白質をコードする D N A、該蛋白質の製造方法、該蛋白質を認識する抗体及び該蛋白質の用途を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、アルツハイマー病に関連するヒト N a p 1 (Nck associated protein 1) 蛋白質を単離し、該蛋白質をコードする D N A をクローニングすることに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の(1)～(19)に関する。

(1) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するヒト N a p 1 蛋白質、または配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列において、一個以上（好ましくは 1 若しくは数個）のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、アポトーシス抑制活性を有する蛋白質。

上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1 若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

かかる 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアポトーシス抑制活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold spring Harbor Laboratory Press (1989)（以下、モレキュラー クローニング 第2版と略す）、

配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。

(5) 前記(2)~(4)のいずれかに記載のDNAとベクターとを含む組換えベクター。

(6) 前記(5)記載のベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(7) 前記(6)記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に前記(1)記載の蛋白質を生成蓄積させ、得られる培養物から蛋白質を採取することを特徴とする前記蛋白質の製造方法。

(8) 前記(1)記載の蛋白質を有効成分として含むアルツハイマー病治療薬。

(9) 前記(2)~(4)のいずれかに記載のDNAの塩基配列のうち、連続した5~60残基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、または該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド。

(10) 配列番号17または18で表わされる塩基配列を有する前記(9)記載のオリゴヌクレオチド。

(11) 配列番号26または28で表わされる塩基配列を有する前記(9)記載のオリゴヌクレオチド。

(12) 前記(9)または(10)記載のオリゴヌクレオチドを用いた、ヒトNapl遺伝子のmRNAの検出法。

(13) 前記(9)または(10)記載のオリゴヌクレオチドを含有する、アルツハイマー病の診断薬。

(14) 前記(9)または(11)記載のオリゴヌクレオチドを用いた、ヒトNapl遺伝子の転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(15) 前記(9)または(11)記載のオリゴヌクレオチドを含有する、アポトーシスが関与する疾患の治療薬。

(16) 前記(1)記載の蛋白質を認識する抗体。

(17) 前記(16)記載の抗体を用いた、請求項1記載の蛋白質の免疫学的検出法。

(18) 前記(16)記載の抗体を含有する、アルツハイマー病診断薬。

(19) 前記(16)記載の抗体を有効成分として含有する、アポトーシスが関与す

B S レターズ (FEBS Letters), 351, 231 (1994)] を利用し、アルツハイマー病発症に関連する DNA を調製する。

すなわち、まず散発性アルツハイマー病患者とアルツハイマー病でない人の脳から全 RNA を調製する。脳組織から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、A G P C 法 [実験医学, 9, 1937 (1991)] などがあげられる。

また全 RNA からポリ (A) + RNA として mRNA を調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング 第 2 版) 等があげられる。

さらに、ファースト・トラック・mRNA・アイソレーション・キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA・ピュリフィケーション・キット [Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] などのキットを用いて脳組織から直接 mRNA を調製することもできる。

脳組織より抽出した上記各々の RNA から、アンカープライマーを用いて常法により cDNA を合成し、続いて、これら各々の cDNA に対してアンカープライマーと任意プライマーとを用いて PCR を行い、cDNA を増幅する。

アンカープライマーとは、mRNA の 3' 末端ポリ A 配列に会合するオリゴ dT 配列の 3' 末端に、チミジンを除く、アデニン、グアニンまたはシトシンのオリゴヌクレオチドを付加したプライマーであり、例えば、配列番号 4 ~ 6 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをあげることができる。

任意プライマーとは、多種類の cDNA の配列に対して増幅し、かつ一度の反応で多数の cDNA 増幅断片を得ることができるオリゴヌクレオチドのことであり、オペロン・テクノロジーズ (Operon Technologies) 社製の OPA-1 ~ 20、OPB-1 ~ 20、OPC-1 ~ 20、OPD-1 ~ 20 等をあげることができる。任意プライマーの長さとしては、10 ~ 20 塩基程度が好ましい。

続いて、PCR により増幅された上記各々の cDNA を、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、サイバーグリーン I などの DNA 特異的な蛍光染色剤で、増

には、下記（１）～（３）の方法により cDNA 全長を得ることができる。

（１）cDNA ライブラリーの利用

上記 DNA 断片をプローブとして、各種 cDNA ライブラリーを用いたハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行うことにより、cDNA 全長を得ることができる。

以下に cDNA ライブラリーの作製法について述べる。

cDNA ライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング 第 2 版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology)、サブルメント 1～34 (Supplement 1～34)、グリーン・パブリッシング・アソシエイツ・アンド・ウェイリーインターサイエンス (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)、1987-1996 年版、以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント 1～34 と略記する] 等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ライフ・テクノロジーズ (Life Technologies) 社製] やザップー cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法などがあげられる。さらに、cDNA ライブラリーそのものの市販品、例えばクローンテック (Clontech) 社のヒト脳 cDNA ライブラリー等を利用することができる。

cDNA ライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11 [DNA クローニング、ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、 $\lambda$ TriplEx (クローンテック社製)、 $\lambda$ ExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] お

確認することができる。

上記方法により確認された新規な塩基配列を有するDNAとして、例えば、配列番号1で表される配列を有するDNA等をあげることができる。また、配列番号2に本発明のヒトNap1蛋白質のアミノ酸配列を例示するが、このアミノ酸配列からなるタンパク質がアポトーシス抑制活性を有する限り、当該アミノ酸配列において1個以上（好ましくは1若しくは数個）のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。例えば、配列番号2で表わされるアミノ酸配列の第1番目のメチオニンが欠失した配列を有するものなども、アポトーシス抑制活性を有する限り本発明の蛋白質に含まれる。

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

該DNAおよびDNA断片を用いて、常法又はDNA合成機により、アポトーシスに関与するDNAの一部の配列を有するオリゴヌクレオチドおよびアンチセンス・オリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドまたはアンチセンス・オリゴヌクレオチドとして、例えば、検出したいmRNAの一部の塩基配列において、5'末端側の塩基配列に相当するセンスプライマー、3'末端側の塩基配列に相当するアンチセンスプライマー等をあげることができる。ただし、mRNAにおいてウラシルに相当する塩基は、オリゴヌクレオチドプライマーにおいてはチミジンとなる。

センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとしては、それぞれの融解温度（ $T_m$ ）および塩基数が極端に変わることのないオリゴヌクレオチドであって、5～60残基のものが挙げられるが、10～40残基数のものが好ましい。

ヒトNap1のDNAの一部の塩基配列を有するセンス・オリゴヌクレオチドまたはアンチセンス・オリゴヌクレオチドとして、例えば、センス・オリゴヌクレオチドについては配列番号17、21、23または24で表されるものを、



社)、pTrs30 [Escherichia coli JM109/pTrS30 (FERM BP-5407)より調製]、pTrs32 [Escherichia coli JM109/pTrS32 (FERM BP-5408)より調製]、pGKA2 [Escherichia coli JGKA2 (FERM BP-6798)より調製、特開昭60-221091]、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pGEX (ファルマシア社)、pETシステム (ノバジェン社)、pSupex等を例示することができる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、t r pプロモーター (P t r p)、l a cプロモーター、P Lプロモーター、P Rプロモーター、T 7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。また P t r pを2つ直列させたプロモーター (P t r p×2)、t a cプロモーター、l a cT 7プロモーター、l e t Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354等をあげることができる。

early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー・サブルメント1-34、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac111 (ともにインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などを用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W.H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、

ウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下の条件下で行う。培養温度は35～37℃がよく、培養時間は、通常3～7日間である。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーマンジェン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製〕等を用いることができる。

培養温度は25～30℃がよく、培養時間は、通常1～4日間である。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

製)、パーキンエルマージャパン(米国Perkin-Elmer社製)、ファルマシアバイオテク(スウェーデンPharmacia Biotech社製)、アロカ(米国Protein Technology Instrument社製)、クラボウ(米国Synthecell-Vega社製)、日本パーセプティブ・リミテッド(米国PerSeptive社製)、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

### 3. アルツハイマー関連抗体の調製

本発明の抗体としては、上記の蛋白質またはポリペプチドに特異的に結合できるものであれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等いずれの抗体であってもよい。

ポリクローナル抗体は、抗原を免疫した動物から得られる血清を分離、精製することにより調製することができる。モノクローナル抗体は、抗原を免疫した動物から得られる抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗原は、各種ヒト培養細胞から本発明の蛋白質を精製するか、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または配列番号2に示されるアミノ酸配列のうち1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつアポトーシス抑制活性を有する蛋白質をコードするDNAを含む組換えベクターを大腸菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞などの宿主に導入して、蛋白質を発現させて得られる蛋白質を分離、精製することにより調製できる。また、抗原は、配列番号2に示されるアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドをアミノ酸合成機を用いて合成することによっても調製できる。

免疫する方法としては、抗原をウサギ、ヤギまたは3~20週令のラット、マウスもしくはハムスター等、非ヒト哺乳動物の皮下、静脈内または腹腔内にそのまま投与してもよいが、抗原をスカシガイヘモシアニン、キーホールリンペットヘモシアニン、牛血清アルブミン、牛チログロブリン等、抗原性の高いキャリアタンパク質とを結合させて投与したり、フロインドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチン

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、またはハイブリドーマ細胞を動物の腹腔内に投与して該動物を腹水癌化させて得られる腹水から分離、精製することにより調製できる。

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、硫酸沈殿、カプリル酸沈殿、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインA若しくはG-カラム、若しくはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等による方法を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

#### 4. ヒトN a p 1のDNA、蛋白質または抗体の利用

(1) 1. 記載のDNAを用い、ノーザン・ハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング 第2版)、PCR法[PCR Protocols, (1990)]、RT (reverse-transcribed) - PCR法等により、本発明のヒトN a p 1遺伝子のmRNAを検出することができる。

(2) 上述(1)に記載した方法により、健常者の脳組織および被験者の脳組織におけるヒトN a p 1遺伝子のmRNAを検出し、その発現量を健常者と被験者とで比較し、発現量が低下しているかどうかを調べることにより、被験者でのアルツハイマー病の診断を行うことができる。

mRNAの発現量は、ノーザン・ハイブリダイゼーション法の場合は、ハイブリダイズしたプローブの量をプローブの標識に応じて、例えば<sup>32</sup>P標識の場合は放射エネルギーを、蛍光標識の場合は蛍光量を測定することにより測定できる。RT-PCR法の場合は、例えば増幅断片をエチジウムブロミドやサイバークリーンIなどのDNA特異的な蛍光染色剤で染色し、その蛍光量を測定することにより測定できる。

(3) 本発明のDNAを用い、体細胞ハイブリッド形成法[Annual Review of Genetics, 9, 407 (1975)]やin situハイブリダイゼーション法を行うことにより、ヒトN a p 1遺伝子の存在する染色体の位置を決定することができる。

体細胞ハイブリッド形成法では、以下のようにしてヒトN a p 1遺伝子の存在する染色体の番号を決定する。まず、ヒト細胞とマウスまたはハムスターの株細

キシゲニンで標識することにより検出する方法である。DNAラダー検出法は、アポトーシスによっておこるクロマチンDNAの断片化を、細胞からDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動をすることにより検出する方法で、断片化したDNAがラダー（はしご）状に検出される。DNAの断片化率の定量は、断片化した低分子DNAのみを抽出し、ジフェニルアミンを用いてDNAの定量を行う方法である。細胞サイズ分布測定は、アポトーシスにより細胞の収縮や断片化がおこり小さなサイズの細胞が増加するのを、コールター・マルチサイザー（Coulter multisizer）等の粒子サイズ測定装置を利用して測定する方法である。これらの方法により、細胞がアポトーシスをおこしているかどうかを検出することができる。

（５） １．記載のアンチセンス・オリゴヌクレオチド（RNA/DNA）を用いて〔化学、46, 681（1991）、Bio/Technology, 9, 358（1992）〕、DNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制することにより、アポトーシスを誘導し、アポトーシスの抑制が病態に関与している疾患の治療に利用することができる。

例えば、オリゴヌクレオチドは、細胞への取り込みを助けるための、細胞膜との親和性の高い適当な担体、例えばリポソームやコレステロール等と共に患者の患部又は全身に注射により投与し、患者の細胞に取り込ませてアポトーシスを誘導することにより、治療することができる。

アポトーシスの抑制が病態に関与している疾患として、例えば、ガンあるいは全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、多発性硬化症等の自己免疫疾患等をあげることができる。

多くのガン細胞において、アポトーシス誘導因子であるp53等の遺伝子に欠失等の変異が見出されている〔ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー（British Journal of Cancer）, 68, 653（1993）〕。そして、このような細胞では、通常の組織では遺伝子の変異等の異常が起きた細胞を排除しているアポトーシス機構が働かなくなるため、ガン細胞の増殖が進行していくと考えられている。また多くの細胞でアポトーシス抑制遺伝子として働くbcl-2のアンチセンス・オリゴDNAが動物実験においてヒトの結腸ガンの成長を抑止させることができるという報告（日経バイオ最新用語辞典、日経BP社 1995年）もあ

定剤、緩衝剤、保存剤、等張化剤等の添加剤を含有し、通常、単位投与量アンブル又は多投与量容器によるものが挙げられる。

さらに、本発明の蛋白質を有効成分として含むアポトーシスが関与する疾患の治療薬は、投与経路に応じて、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤形に応じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択されるが、これらに限定されるものではない。

本発明の蛋白質を投与する適用となる疾患、すなわち、アポトーシスの誘導が病態に関与している疾患として、進行性の神経変性疾患、例えばパーキンソン病 [ジャーナル・オブ・ニューロロジカル・サイエンス (Journal of Neurological Sciences), 137, 120 (1996)] や筋萎縮性側索硬化症 [ニューロパソロジー・アンド・アプライド・ニューロバイオロジー (Neuropathology and Applied Neurobiology), 21, 498 (1995)]、ハンチントン舞蹈病 [Experimental Neurology, 133, 265 (1995)、ニューロリポート (Neuroreport), 6, 1053 (1995)、ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス (Journal of Neuroscience), 15, 3775 (1995)]、網膜色素変性症 [Neuron, 11, 595 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 974 (1994)]、緑内障 [インベスティゲイティブ・オブサルモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス (Investigative Ophthalmology & Visual Science), 36, 774 (1995)、ジャーナル・オブ・グローコーマ (Journal of Glaucoma), 5, 345, (1996)]、アルコール性肝炎 [ジャーナル・オブ・ヘパトロジー (Journal of Hepatology), 6, 137, (1988)、ジャーナル・オブ・パソロジー (Journal of Pathology), 171, 73 (1993)] などがあ

### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例にその技術的範囲を限定するものではない。

#### 実施例 1 ヒト Nap1 遺伝子の cDNA 断片のクローン化

##### (1) 脳からの全 RNA の取得

散発性アルツハイマー病の患者 10 名、アルツハイマー病でない人 3 名の大脳皮質から全 RNA をトリゾル試薬 (ライフ・テクノロジーズ社製) を用いて取得した。具体的な方法は試薬の説明書の指示に従った。この RNA をリボヌクレアーゼフリーデオキシリボヌクレアーゼ [プロメガ (Promega) 社製] で処理して、コンタミしている DNA を除去した後、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、ジエチルピロカーボネート (diethyl pyrocarbonate; DEPC) 処理した蒸留水に溶解した。

##### (2) 全 RNA を用いたディファレンシャル・ディスプレイ

伊藤らの方法 [FEBS Letters, 351, 231 (1994)] によりディファレンシャル・ディスプレイを行った。すなわち、(1) で取得したそれぞれの RNA 2.5  $\mu$ g と配列番号 4 から 6 に示す 3 種類のうちの 1 種類のアンカープライマー 50 pmol を混ぜ、全体が 10  $\mu$ l になるように DEPC 処理した蒸留水を添加し、70°C で 10 分間加熱後、すぐ氷水に漬けて急冷した。ここに、200 単位の逆転写酵素スーパースクリプト・ツー・リボヌクレアーゼエッチマイナス・リバーstransスクリプターゼ (SUPERScript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase; ライフ・テクノロジーズ社製) を含む 2 × 逆転写酵素反応用緩衝液 [40mM トリス (Tris) -HCl (pH8.4)、100mM KCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、20mM ジチオスレイトール (DTT) 2  $\mu$ l、0.2mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA)、1 mM dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)] 10  $\mu$ l を添加して混合し、25°C で 10 分間、42°C で 50 分間反応させて cDNA を合成し、90°C で 5 分間加熱して反応を停止させた。この反応液に TE 緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA] 80  $\mu$ l を添加し 5 倍に希釈した。

合成した各々の cDNA 2  $\mu$ l に 10 × PCR 用緩衝液 [100mM Tris-HCl (pH8.8)、500mM KCl、15mM MgCl<sub>2</sub>、1% トライトン (Triton) X-100、1mM dNTP] 2  $\mu$ l、5 pmol ア



DNAポリメラーゼGene Taq 1 単位を添加し、PCRを行うことにより、ゲルに含まれる断片をさらに増幅させた。PCRの反応条件は、94℃で30秒間、55℃で1分間、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとして30サイクル反応を行った。反応後の液を、エタノール沈殿をし、10  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解させた。

増幅断片1  $\mu$ lとPCR断片クローニング用ベクターpT7Blue T-Vector（ノバジェン社製；プラスミドpT7BlueのEcoR Vサイトを切断し、両鎖の3'末端にdTを1個付加してあるベクター）1  $\mu$ lを混合し、DNAライゲーションキットVer. 2（宝酒造社製）を用いて、キットの指示に従い、プラスミドに増幅断片を組み込んだ。大腸菌DH5  $\alpha$ （ライフ・テクノロジーズ社製）を形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。該形質転換株コロニーを、滅菌した楊子で突ついてPCR反応液25  $\mu$ lに懸濁させ、DNAポリメラーゼGene Taq 1 単位を添加し、増幅断片の再増幅と同じ条件でPCRを行った。この反応液2  $\mu$ lと、（2）でこの増幅断片を得たときのPCRの反応液2  $\mu$ lについて、（2）のディファレンシャル・ディスプレイと同様の電気泳動と蛍光染色を同じゲル上に並べて行い、フルオロイメージャーで増幅断片を検出した。コロニーを鋳型にしたPCRにより、（2）のPCR反応液で見られる選択したバンドと全く同じ位置に断片が増幅することから、該形質転換株には選択したバンドのDNAが含まれると判断した。

この形質転換体をクローン9-1とし、該クローン9-1よりプラスミドp9-1を単離した。

#### （4）増幅断片の塩基配列の決定

p9-1に含まれる増幅断片の塩基配列を決定した。塩基配列決定はシーキサーム・ロング・リード・サイクル・シークエンス・キット [SequiTherm Long-Read Cycle Sequencing Kit；エピセンター・テクノロジーズ（Epicentre Technologies）社製] を用いて反応を行い、ALF DNAシークエンサー（ファルマシア社製）を用いて決定した。反応の試薬と方法はキットの指示に従った。得られた塩基配列を配列番号3に示したが、塩基配列は265ヌクレオチドであり、配列番号1の塩基配列3986～4236番目に相当した。なお、配列番号3の1-15

でない人の大脳皮質RNAに対し、9-1はヒトNap-1遺伝子に特異的なプライマー、efl $\alpha$ はコントロールとして用いた伸長因子1 $\alpha$ 遺伝子特異的なプライマーをそれぞれ用いた結果を示す。

図1の結果より、散発性アルツハイマー病患者10例全てにおいて、コントロールのアルツハイマー病でない人10例と比較して、増幅断片の量が低下していることから、アルツハイマー病患者の大脳皮質ではクローン9-1の遺伝子のmRNAの発現量が低下していることが確認された。

なお、mRNAの量自身に変化がないことは、ハウスキーピング遺伝子である伸長因子1 $\alpha$  (efl $\alpha$ ) 遺伝子について、配列番号19および20に示したefl $\alpha$ 特異的プライマーを用いて同様のRT-PCRを行うことによって確認した。ただし、PCRの反応条件は94℃で3分間加熱した後、94℃で30秒間、58℃で1分間、72℃で2分間からなる工程を1サイクルとして25サイクル反応を行い、最後に72℃で5分間反応させた。

### 実施例3 クローン9-1の全長cDNAのクローン化

#### (1) cDNAライブラリーからのcDNAクロンの取得

ヒト大脳皮質cDNAライブラリー(クローンテック社製)からブランクハイブリダイゼーションにより、cDNAクロンの取得を行った。2 $\times$ 10<sup>5</sup>ブランクをプロットしたナイロンメンブレンフィルター[ハイボンドN<sup>+</sup>(Hybond N<sup>+</sup>); アマシャム社製]について、ハイブリダイゼーション溶液[6 $\times$ SSC、10 $\times$ デンハルト溶液(0.2% BSA、0.2% フィコール、0.2% ポリビニルピロリドン)、1% (w/v) SDS、200  $\mu$ g/mlの超音波処理後変性(沸騰水中で5分加熱後水中で急冷した)させたサケ精子DNA]中にフィルターを密封し、60℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行った。

プローブの作製は以下のように行った。すなわちクローン9-1のプラスミドDNAを鋳型にして、配列番号21および18のプライマーを用いて、実施例1と同様にして1 $\times$ PCR反应用緩衝液中でPCRを行い、配列番号3の26番めから211番めに相当するcDNA部分を増幅させた。PCRの条件は94℃で20秒、58℃で30秒、72℃で1分からなる工程を1サイクルとして30サ

の結果、配列番号 1 の 1 6 6 - 4 2 3 6 番目に当たる 4 0 7 1 b p の塩基配列は決定できたが、これよりも 5' 末側の塩基配列は決定できなかった。

### (3) 5'-RACEによる cDNA クローンの取得

cDNA 全体の塩基配列を明らかにするため、5'-RACE を行った。ヒト脳ポリ (A) +RNA (クローンテック社製) について、配列番号 22 に示した cDNA 特異的プライマーと 5'-RACE キットであるライフ・テクノロジー社の 5'-RACE システムを用いることにより、プライマーの配列に対応する cDNA の部分 (配列番号 1 の 3 1 4 - 3 3 8 番めの塩基配列に相当する) より 5' 側の cDNA を含むと考えられる約 0.3 kb の DNA 断片を増幅した。

5'-RACE の具体的方法はキットの説明書の指示に従った。この DNA 断片を実施例 1 (3) と同様にして、ベクター pT7Blue T-Vector にクローン化し、pRCOM を得た。

pRCOM を含有する大腸菌形質転換株 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  /pRCOM は、FERM BP-6202 として、平成 9 年 12 月 10 日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) にブダペスト条約に基づいて国際寄託されている。

### (4) cDNA の塩基配列の決定

5'-RACE で得られたクローン pRCOM の cDNA の塩基配列を、実施例 1 (5) と同様にして決定し、この塩基配列と実施例 4 (2) で決定した p9-1-6 の cDNA の塩基配列とつなぎ合わせることにより、9-1 の全長 cDNA と考えられる塩基配列が得られた。この塩基配列は 4 2 3 6 bp からなり、その中に 1 1 2 8 アミノ酸からなるオープンリーディングフレーム (ORF) が存在した。このアミノ酸配列を配列番号 2 に示した。

この塩基配列を、相同性検索用プログラム BLAST を用いて塩基配列データベース GenBank と比較したところ、該塩基配列と一致する塩基配列は EST ではいくつか、例えばアクセス番号 AA307472、R58000、N44074 のもの等が見出されたが、既存の塩基配列にはなく、新規な塩基配列であった。なお、一致が見られた EST は、すべて ORF の途中から一致したもので

チュ・ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization: FISH) を文献 [ゲノミクス (Genomics), 17, 153 (1993)] に基づいて行った。すなわち、健常人男性のリンパ球から、チミジン同調法によりヒトのメタフェーズの染色体を調製し、プロモデオキシウリジン放出法によりRバンド染色標本を作成した。ハイブリダイゼーション前に染色体をヘキスト33258によって染色し、紫外線照射を行った。hNAP1のcDNA約4.2kbをビオチン-16-<sup>3</sup>dUTPを用いたニックトランスレーションによってビオチン標識してプローブとした。ハイブリダイゼーション溶液 [50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸 [シグマ (Sigma) 社製]、2×SSC、2μg/μlの超音波処理後変性サケ精子DNA、2μg/μl大腸菌tRNA] にビオチン標識プローブを終濃度25ng/μlになるように添加して、変性染色体標本とハイブリダイズさせた。

文献 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2934 (1986)] の方法に従い、FITC標識アビジン (ベーリンガー・マンハイム社製) と反応させ、蛍光を増幅するため、さらにビオチン標識抗アビジンD [ベクター (Vector) 社製] と反応させた後、再度FITC標識アビジンを反応させ、ハイブリダイズした部位を検出した。染色体は1μg/μlヨウ化プロビジウムを用いて染色した。

その結果、本発明の遺伝子が存在する染色体上の位置は、2番染色体の長腕q32であり、2q32.1-2q32.2に存在することがわかった。

#### 実施例5 ヒトNap1 mRNAの各組織での発現の検出

##### (1) ヒト各組織でのヒトNap1遺伝子のノーザンブロット

ヒトの各組織におけるNap1遺伝子のmRNAの発現を調べるために、クローンテック社のヒトの各組織のmRNAをプロットティングしたフィルターMTN・ブロット [MTN (Multiple Tissue Northern) Blot] を用いて、ノーザンブロットによりヒト各組織中のNap1のmRNAの発現を検出した。用いた、ヒト・MTN・ブロットには、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および脾臓のmRNAが、ヒト・MTN・ブロットIIには、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸および末梢白血球のmRNAが、ヒト脳・MTN・ブロットIIIには小脳扁桃、尾状核、脳梁、海馬、視床下部 (全脳)、黒質、視床腹側部

### (2) ヒト神経系細胞株でのN a p 1 遺伝子のR T - P C R

脳では神経細胞とグリア細胞のどちらで主に発現が見られるのかを、細胞株のR T - P C Rにより調べた。神経芽細胞腫株であるS H - S Y 5 Y [国立神経科学研究所 高坂新一博士から供与された、*Cancer Research* , 33, 2643 (1973)] およびL A - N - 5 [九州大学 山田猛博士から供与された、*Experimental Cell Research* , 148, 21 (1983)] とグリア細胞腫株であるU - 2 5 1 [九州大学 山田猛博士から供与された; *ジャーナル・オブ・ニューロパソロジー・アンド・エクスペリメンタル・ニューロロジー* (Journal of Neuropathology & Experimental Neurology) , 40, 390 (1981)] それぞれを、10%ウシ胎児血清、100単位/mlペニシリン、100mg/mlストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地 [D M E M (Dulbecco's modified Eagle's medium)] で、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中37℃で培養した。それぞれの細胞から全RNAを単離し、実施例2と同様にしてR T - P C Rを行った。

結果を図4に示す。図4において、左から示すS H - S Y 5 Y、L A - N - 5、U - 2 5 1は前記各細胞であり、h N A P - 1はヒトN a p 1 遺伝子に特異的なプライマー、e f 1 αはコントロールとして用いた伸長因子1 α 遺伝子特異的なプライマーをそれぞれ用いた結果を示す。

図4に示すように、神経芽細胞腫株であるS H - S Y 5 YおよびL A - N - 5ではN a p 1 遺伝子の発現が検出されたが、グリア細胞腫株であるU - 2 5 1では発現が検出されなかった。したがって、本発明の遺伝子は、脳の中でも、グリア細胞よりも神経細胞で主に発現していると考えられた。

### (3) 脳でのヒトN a p 1 遺伝子のイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション

本発明の遺伝子が脳（主に神経細胞）で発現していることを確認するため、ヒト脳組織に対してイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション (*in situ hybridization*) を行った。

試料とするヒト脳組織は、死後、脊髄、小脳、中脳、基底核、前頭部大脳皮質、海馬の各組織をホルマリンで固定し、パラフィン包埋したものをを用いた。

た。

その結果、センスプローブではほとんどシグナルが見られないのに対して、アンチセンスプローブでは神経細胞が密度高く詰まっている組織である小脳、海馬、扁桃で高い発現が見られた。一方グリア細胞が多く存在する白質では発現は非常に低かった。さらに顕微鏡レベルで調べると、小脳の顆粒細胞層、小脳のプルキンエ細胞、海馬の神経細胞、歯状回、扁桃様核、大脳皮質で高い発現がみられ、グリア細胞よりも、神経細胞で主に発現していることが確認された。また、このアンチセンスプローブは、固定後、パラフィン包埋した若い成体のラットの脳に対して同様の検出を行うことができた。脳の固定は、ラットを麻酔した後、4%パラホルムアルデヒド/10mM リン酸緩衝液で灌流することにより行った。

#### 実施例6 ヒトNap1遺伝子アンチセンスDNAによるアポトーシスの促進

##### (1) アンチセンスDNAによるSH-SY5Y細胞の細胞死の促進

神経芽細胞腫株SH-SY5Yは実施例5(2)と同様に培養した。配列番号26に示す塩基配列をもつヒトNap1アンチセンス・フォスフォロチオエート・オリゴデオキシヌクレオチド(PS-ODN)、及び対照用として配列番号27に示す塩基配列を持つヒトNap1センスPS-ODNを合成し(東亜合成社製)、それぞれリポフェクトアミン(Lipofect Amine)試薬(ライフ・テクノロジーズ社製)4 $\mu$ lと混合し、200 $\mu$ lのDMEMに添加して室温で30分間インキュベート後、800 $\mu$ lのDMEMを加え、PS-ODNの終濃度4.5 $\mu$ Mになるよう、SH-SY5Y細胞の培地中に添加した。さらに12時間培養を続け、PS-ODNをSH-SY5Y細胞に取り込ませた。培地をPS-ODNを含まないものに交換し、さらに培養を続けた。培地交換してから48時間後、アンチセンスPS-ODNを取り込ませた細胞の多くは細胞の形が丸く変化して培地中に浮き上がり、多数の死細胞が観察された。一方、対照用のセンスPS-ODNを取り込ませた細胞は全く変化が見られなかった。

##### (2) アンチセンスDNAによるSH-SY5Y細胞のアポトーシスの促進

(1)と同様にして、アンチセンスPS-ODNまたはセンスPS-ODNを

微的なDNAラダーが観察された。このDNAラダーは、センスPS-ODNあるいはリボフェクトアミン試薬のみを添加して60時間後の細胞では観察されなかった。また、アンチセンスPS-ODNを取り込ませた細胞を上記と同様に経時的に回収し、実施例2と同様にヒトNap1遺伝子に対するRT-PCRを行ったところ、アンチセンスPS-ODNを添加して細胞に取り込ませるため12時間培養した直後から、ヒトNap1遺伝子のmRNAの発現が低下していることが確認された(図5B)。

またNap1遺伝子の別の位置と対応する、配列番号28に示すヒトNap1アンチセンスPS-ODN(東亜合成社製)と、対照用の配列番号29に示すセンスPS-ODN(東亜合成社製)とについて、同様にリボフェクトアミン試薬を用いてSH-SY5Yに取り込ませ、培地交換後60時間後の細胞についてDNAを電気泳動し調べたところ、やはりアンチセンスPS-ODNを取り込ませた細胞の上清ではアポトーシスをおこした細胞に特徴的なDNAラダーが観察されたが、センスPS-ODNではDNAラダーはみられなかった。

したがって、アンチセンスPS-ODNを細胞に取り込ませることによりNap1遺伝子の発現量が低下し、SH-SY5Y細胞にアポトーシスが引き起こされたことがわかった。このことから、Nap1遺伝子は細胞のアポトーシスを抑制していると考えらる。

また、in situ 末端標識アッセイ法[ジャーナル・オブ・セルラー・バイオロジー(Journal of Cellular Biology), 119, 493 (1992)]によるアポトーシスの検出も行った。SH-SY5Yをカバーグラス上にまいて、実施例5(3)と同様の培地で48時間培養した。アンチセンスPS-ODN(配列番号26)あるいは対照用のセンスPS-ODN(配列番号27)を添加して12時間培養し、PS-ODNを取り込ませた後、培地をPS-ODNを含まないものに交換し、さらに24時間培養した。この細胞についてTACSインサイチュアポトーシス検出キット[TACS In situ Apoptosis Detection Kit; トレヴィジェン(Trevigen)社製]を用いてアポトーシスの検出を行った。具体的な試薬と方法はキットの指示に従った。アポトーシスにより切断を受けたヌクレオソーム中のDNAの末端特異的にビオチン標識をし、パーオキシダーゼ標識ストレプトアビ

本発明により、ヒトNap1蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質の製造方法、該蛋白質を認識する抗体及び該蛋白質の用途が提供される。

本発明により得られる新規遺伝子を用いることによりアルツハイマー病の治療や診断が可能である。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号4：合成DNA

配列番号5：合成DNA

配列番号6：合成DNA

配列番号7：合成DNA

配列番号8：合成DNA

配列番号9：合成DNA

配列番号10：合成DNA

配列番号11：合成DNA

配列番号12：合成DNA

配列番号13：合成DNA

配列番号14：合成DNA

配列番号15：合成DNA

配列番号16：合成DNA

配列番号17：合成DNA

配列番号18：合成DNA

配列番号19：合成DNA

配列番号20：合成DNA

配列番号21：合成DNA

配列番号22：合成DNA

配列番号23：合成DNA

配列番号24：合成DNA

配列番号25：合成DNA

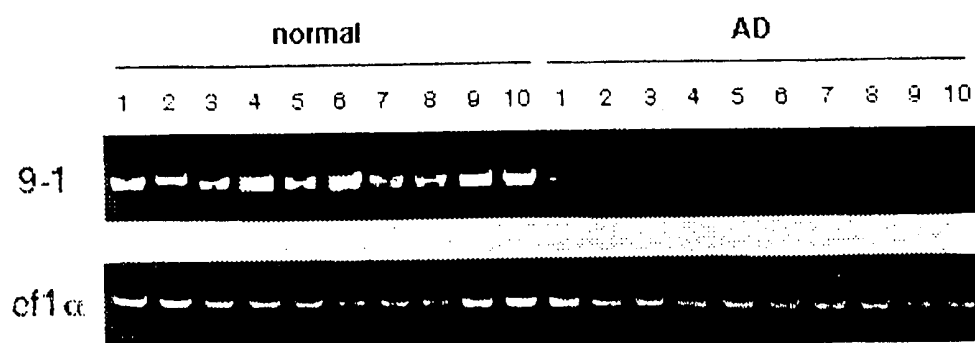
配列番号26：合成DNA



## 請求の範囲

1. 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するヒト Nap 1 蛋白質、または配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列において、一個以上のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、アポトーシス抑制活性を有する蛋白質。
2. 請求項 1 記載の蛋白質をコードする DNA。
3. 配列番号 1 記載の塩基配列を有する DNA。
4. 請求項 2 または 3 記載の DNA の塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アポトーシス抑制活性を有する蛋白質をコードする DNA。
5. 請求項 2 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の DNA とベクターとを含む組換えベクター。
6. 請求項 5 記載のベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。
7. 請求項 6 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 1 記載の蛋白質を生成蓄積させ、得られる培養物から蛋白質を採取することを特徴とする前記蛋白質の製造方法。
8. 請求項 1 記載の蛋白質を有効成分として含むアルツハイマー病治療薬。
9. 請求項 2 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の DNA の塩基配列のうち、連続した 5 ～ 60 残基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、または該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド。
10. 配列番号 17 または 18 で表わされる塩基配列を有する請求項 9 記載のオリゴヌクレオチド。
11. 配列番号 26 または 28 で表わされる塩基配列を有する請求項 9 記載のオリゴヌクレオチド。
12. 請求項 9 または 10 記載のオリゴヌクレオチドを用いた、ヒト Nap 1 遺伝子の mRNA の検出法。
13. 請求項 9 または 10 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、アルツハイマー病の診断薬。

☒ 1





2

```

human MSRVLPQSQ QKLAEKLTIL NDRGVGMLTR LYNIKKACGD PKAKPSYLID KMLESAVKFI VRKFPVAVETR NUNOQLAQLQ KEKSEILKML ALYFTFTVDV WEFKDHVCEL LMTIDVQVNF 120
rat .....
human FDIITVNFOLT KNYDLIITY TTLMLLSRI EERKATIGLY NYAHEMTHGA SDREYPRILGQ MIVDYENPLK KAMEEFVPHS KSLSDALISL QMVYPRRNL S ADQWRINAQLL SLISAPSTM 240
rat .....TV..
human NPAQSDTMPC EYLSLDAMEK WIIFGFILCH GILNTDATAL NLWKLALQSS SCLSLFREDEV FHIHKAEDL FVNIRGYNKR INDIRCKEA AVSHAGSMHR ERRKFLRSAL KELATVLSQ 360
rat .....E...
human PGLLGPKALF VFMAISFARD EIIWLRHAD NMPKKSADDF IDKHIAELIF YMEELRAHR KYGPVMGRYY VOYLSGFDAV VLNELVNILS VCPEDESIIM SSFVNTMTSL SVKQVEDGEV 480
rat .....S
human FDFRGMRLDW FRLQAYTSVS KASGLADHR ELGKMMNTII FHTKMVDSLV EMLVETSLS IFCFYSRAFE KMFOQCLELP SOSRYSIAFP LLCTHFMSCT HELCPPEERHH IGDRSLSLCH 600
rat .....
human MFLDEMAKQA RNLITDICTE QCTILSDQLLP KHCAKTISQA VNKKSKKQTG KKGPEREKP QVESMRKURL VTNLKLHT ALSELCSIN YVPMVWEH TFTPREYLS HLEIRFTKSI 720
rat .....
human VGMTHVNOAT QEIAPSELL TSVRAYMTVL QSIENVQID ITRFVNNVL QQTQHLDSHG EPTITSLYTN WYLETLRQV SNGHIAFYPA MKAFVNLPT E MELTFMAEY SDISEMRSL S 840
rat .....E...
human ELLGPYGMKF LSESLMHHIS SOVAELKKLV VENVDVLTOM RTSFDPKQDM AALFKRLSSV DSVLKMNTII GVILSFRSLA QEALRDVLSY HIPFLVSSIE DFKDHIPRET DMKVAMNVE 960
rat .....
human LSSAAGLPCE IDPALVWALS SOKSEHISPE EYKIACLLM VFVAVSLPTL ASHWMSQYSP AIEGHCHNHH CLAKAINQIA AALFTIHGGS IEDRLKEFLA LASSLLKIG QETDKTTIRN 1080
rat .....
human RESVYLLLDW IVOESPFLTM DLLESCFPYV LLRNAYHAVY KQSVTSSA 1128
rat .....

```



☒ 4

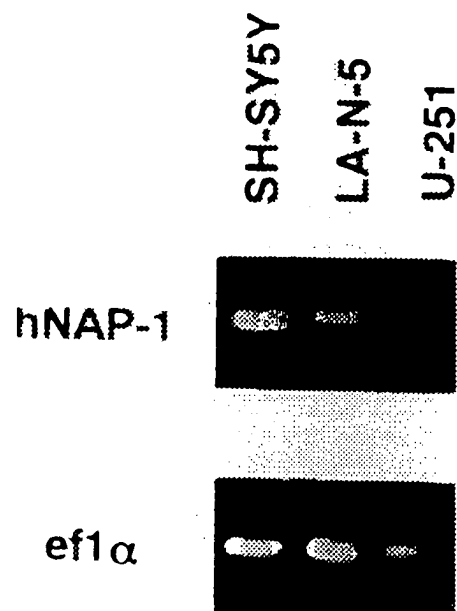


図 5 A

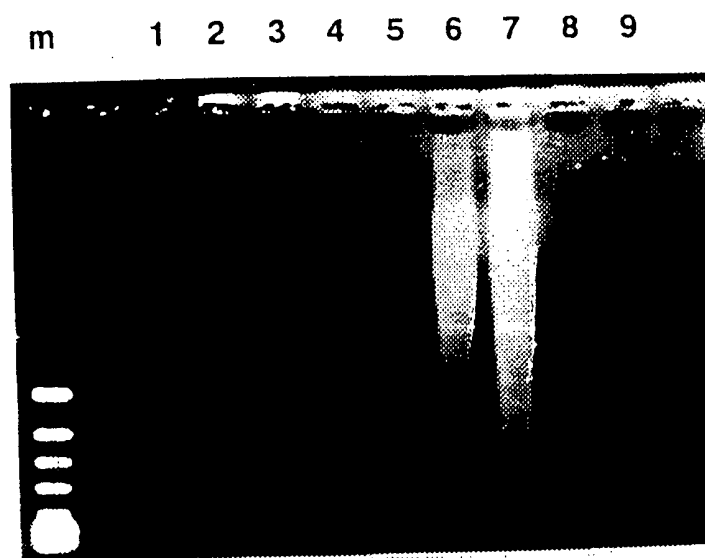
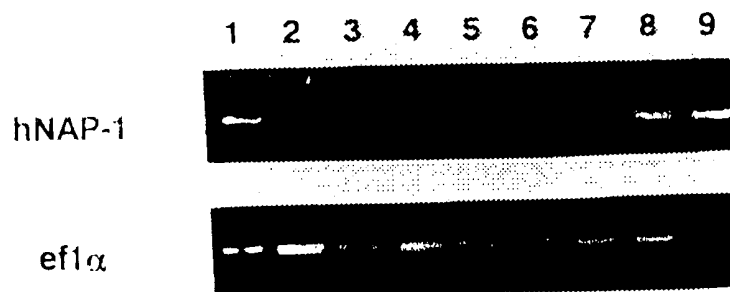


図 5 B



SEQUENCE LISTING

<110> SAKAKI, YOSHIYUKI

KYOWA HAKKO KYOGYO CO., LTD.

<120> Human Napl Protein

<130> PH-603PCT

<140>

<141>

<150> JP97/363183

<151> 1997-12-15

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 4236

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (20)..(3406)

<400> 1

cggcggcacc agcaccacc atg tgc cgc tca gtg ctg cag ccc agt cag cag 52

Met Ser Arg Ser Val Leu Gln Pro Ser Gln Gln

1

5

10

aag ctg gcg gag aag ctc acc atc ctc aac gac cgg ggc gtc ggc atg 100

Lys Leu Ala Glu Lys Leu Thr Ile Leu Asn Asp Arg Gly Val Gly Met

15

20

25

ctc acc cgc ctc tac aac atc aag aag gca tgt gga gac ccc aag gca 148

Leu Thr Arg Leu Tyr Asn Ile Lys Lys Ala Cys Gly Asp Pro Lys Ala

30

35

40

aaa cca tcc tat ctt atc gac aaa aac ctg gaa tct gct gtg aaa ttc 196

Lys Pro Ser Tyr Leu Ile Asp Lys Asn Leu Glu Ser Ala Val Lys Phe

45

50

55

ata gtc aga aaa ttc cct gct gta gaa acc cgc aac aac aat caa cag 244

Ile Val Arg Lys Phe Pro Ala Val Glu Thr Arg Asn Asn Asn Gln Gln

60

65

70

75

ctt gca caa cta cag aaa gaa aaa tca gag att ctg aaa aat ctg gca 292

Leu Ala Gln Leu Gln Lys Glu Lys Ser Glu Ile Leu Lys Asn Leu Ala

80

85

90

tta tat tac ttc aca ttt gta gat gtt atg gaa ttt aag gac cat gtt 340

Leu Tyr Tyr Phe Thr Phe Val Asp Val Met Glu Phe Lys Asp His Val

95

100

105

tgt gaa ttg ctg aat act att gac gtt tgc caa gtc ttc ttt gat att 388



Cys Glu Leu Leu Asn Thr Ile Asp Val Cys Gln Val Phe Phe Asp Ile  
 110 115 120

act gta aac ttt gat tta aca aag aac tac tta gat tta att ata acc 436  
 Thr Val Asn Phe Asp Leu Thr Lys Asn Tyr Leu Asp Leu Ile Ile Thr  
 125 130 135

tat aca aca cta atg ata ctg ctg tct cga att gaa gaa agg aag gca 484  
 Tyr Thr Thr Leu Met Ile Leu Leu Ser Arg Ile Glu Glu Arg Lys Ala  
 140 145 150 155

atc att gga tta tac aac tat gcc cat gaa atg act cat gga gca agt 532  
 Ile Ile Gly Leu Tyr Asn Tyr Ala His Glu Met Thr His Gly Ala Ser  
 160 165 170

gac aga gaa tac cca cgc ctt ggc cag atg att gtg gat tat gaa aac 580  
 Asp Arg Glu Tyr Pro Arg Leu Gly Gln Met Ile Val Asp Tyr Glu Asn  
 175 180 185

cct tta aag aag atg atg gaa gaa ttt gta ccc cat agc aag tct ctt 628  
 Pro Leu Lys Lys Met Met Glu Glu Phe Val Pro His Ser Lys Ser Leu  
 190 195 200

tca gat gca cta att tct ctt caa atg gta tat cct cga agg aat ctt 676  
 Ser Asp Ala Leu Ile Ser Leu Gln Met Val Tyr Pro Arg Arg Asn Leu  
 205 210 215

tca gct gac cag tgg aga aat gcc cag tta ttg agc ctc atc agt gca 724  
 Ser Ala Asp Gln Trp Arg Asn Ala Gln Leu Leu Ser Leu Ile Ser Ala

220	225	230	235	
cct agt aca atg ctt aat cca gca cag tcc gac act atg cct tgt gaa				772
Pro Ser Thr Met Leu Asn Pro Ala Gln Ser Asp Thr Met Pro Cys Glu				
	240	245	250	
tac ctc tct ttg gat gca atg gaa aag tgg att atc ttt ggc ttt att				820
Tyr Leu Ser Leu Asp Ala Met Glu Lys Trp Ile Ile Phe Gly Phe Ile				
	255	260	265	
ttg tgc cat ggg atc cta aat act gac gct aca gca ctg aac ctt tgg				868
Leu Cys His Gly Ile Leu Asn Thr Asp Ala Thr Ala Leu Asn Leu Trp				
	270	275	280	
aaa cta gct ctt caa agt agc tct tgc ctc tct ctc ttt cgg gat gaa				916
Lys Leu Ala Leu Gln Ser Ser Ser Cys Leu Ser Leu Phe Arg Asp Glu				
	285	290	295	
gtt ttc cac att cac aaa gct gca gaa gac tta ttt gta aac ata cga				964
Val Phe His Ile His Lys Ala Ala Glu Asp Leu Phe Val Asn Ile Arg				
300	305	310	315	
ggc tat aat aaa cgt att aat gac ata aga gaa tgc aag gag gca gcc				1012
Gly Tyr Asn Lys Arg Ile Asn Asp Ile Arg Glu Cys Lys Glu Ala Ala				
	320	325	330	
gtg tca cat gct ggt tca atg cac aga gaa aga cgc aag ttt tta aga				1060
Val Ser His Ala Gly Ser Met His Arg Glu Arg Arg Lys Phe Leu Arg				
	335	340	345	

tct gca ctg aag gaa ttg gct act gtc ctc tct gat caa cct gga ttg 1108

Ser Ala Leu Lys Glu Leu Ala Thr Val Leu Ser Asp Gln Pro Gly Leu

350

355

360

cta ggt ccc aag gca ctt ttt gtt ttt atg gca tta tcc ttt gcc cgt 1156

Leu Gly Pro Lys Ala Leu Phe Val Phe Met Ala Leu Ser Phe Ala Arg

365

370

375

gat gaa atc atc tgg cta ctt cgt cat gca gat aac atg cca aag aag 1204

Asp Glu Ile Ile Trp Leu Leu Arg His Ala Asp Asn Met Pro Lys Lys

380

385

390

395

agt gca gac gac ttt ata gat aag cac att gct gaa tta ata ttt tac 1252

Ser Ala Asp Asp Phe Ile Asp Lys His Ile Ala Glu Leu Ile Phe Tyr

400

405

410

atg gaa gaa ctt aga gca cat gtg agg aaa tac gga cct gta atg cag 1300

Met Glu Glu Leu Arg Ala His Val Arg Lys Tyr Gly Pro Val Met Gln

415

420

425

agg tat tac gtg cag tac ctt tct ggc ttt gat gct gtt gtc ctc aat 1348

Arg Tyr Tyr Val Gln Tyr Leu Ser Gly Phe Asp Ala Val Val Leu Asn

430

435

440

gaa ctc gtg cag aat ctt tct gtt tgc cct gaa gat gaa tca atc atc 1396

Glu Leu Val Gln Asn Leu Ser Val Cys Pro Glu Asp Glu Ser Ile Ile

445

450

455

atg tcc tct ttt gtt aac act atg act tcc cta agt gta aaa caa gtt 1444

Met Ser Ser Phe Val Asn Thr Met Thr Ser Leu Ser Val Lys Gln Val

460

465

470

475

gaa gat ggg gaa gta ttt gat ttc aga gga atg aga tta gat tgg ttt 1492

Glu Asp Gly Glu Val Phe Asp Phe Arg Gly Met Arg Leu Asp Trp Phe

480

485

490

agg tta cag gca tat act agt gtc tca aag gct tca ctt ggc ctt gca 1540

Arg Leu Gln Ala Tyr Thr Ser Val Ser Lys Ala Ser Leu Gly Leu Ala

495

500

505

gat cac aga gaa ctt ggg aag atg atg aat aca ata att ttt cat aca 1588

Asp His Arg Glu Leu Gly Lys Met Met Asn Thr Ile Ile Phe His Thr

510

515

520

aaa atg gta gat tcc ttg gtg gaa atg ttg gtg gaa aca tca gat ctc 1636

Lys Met Val Asp Ser Leu Val Glu Met Leu Val Glu Thr Ser Asp Leu

525

530

535

tcc ata ttt tgt ttt tat agt cgt gct ttt gag aag atg ttt caa cag 1684

Ser Ile Phe Cys Phe Tyr Ser Arg Ala Phe Glu Lys Met Phe Gln Gln

540

545

550

555

tgt ttg gag tta ccc tct caa tca aga tac tca att gca ttt cca cta 1732

Cys Leu Glu Leu Pro Ser Gln Ser Arg Tyr Ser Ile Ala Phe Pro Leu

560

565

570

ctt tgc act cat ttt atg agt tgc acg cat gaa cta tgt cca gaa gag 1780

Leu Cys Thr His Phe Met Ser Cys Thr His Glu Leu Cys Pro Glu Glu  
 575 580 585

cga cat cat att gga gat cgc agt ctt tcc tta tgt aat atg ttc cta 1828  
 Arg His His Ile Gly Asp Arg Ser Leu Ser Leu Cys Asn Met Phe Leu  
 590 595 600

gat gaa atg gcc aaa caa gct cga aat ctc atc act gat att tgc aca 1876  
 Asp Glu Met Ala Lys Gln Ala Arg Asn Leu Ile Thr Asp Ile Cys Thr  
 605 610 615

gaa cag tgt acc ctt agt gac cag ttg cta ccc aag cat tgt gcc aaa 1924  
 Glu Gln Cys Thr Leu Ser Asp Gln Leu Leu Pro Lys His Cys Ala Lys  
 620 625 630 635

act atc agt caa gca gtg aat aag aaa tca aaa aag cag act ggt aag 1972  
 Thr Ile Ser Gln Ala Val Asn Lys Lys Ser Lys Lys Gln Thr Gly Lys  
 640 645 650

aaa ggg gaa cct gaa agg gag aaa cca ggt gtt gag agc atg agg aaa 2020  
 Lys Gly Glu Pro Glu Arg Glu Lys Pro Gly Val Glu Ser Met Arg Lys  
 655 660 665

aac agg ctg gtt gtg acc aac ctt gat aaa ttg cac act gca ctt tct 2068  
 Asn Arg Leu Val Val Thr Asn Leu Asp Lys Leu His Thr Ala Leu Ser  
 670 675 680

gag tta tgc ttc tct ata aat tat gta cca aac atg gtg gta tgg gaa 2116  
 Glu Leu Cys Phe Ser Ile Asn Tyr Val Pro Asn Met Val Val Trp Glu

685	690	695	
cat acc ttt acc cca cga gaa tat ttg act tct cat ctg gaa ata cgc			2164
His Thr Phe Thr Pro Arg Glu Tyr Leu Thr Ser His Leu Glu Ile Arg			
700	705	710	715
ttt acc aag tca att gtt ggg atg act atg tat aat caa gcc aca cag			2212
Phe Thr Lys Ser Ile Val Gly Met Thr Met Tyr Asn Gln Ala Thr Gln			
	720	725	730
gaa att gca aaa cct tca gaa ctt cta aca agt gta aga gca tac atg			2260
Glu Ile Ala Lys Pro Ser Glu Leu Leu Thr Ser Val Arg Ala Tyr Met			
	735	740	745
acc gta ctc cag tca ata gaa aac tat gtg cag att gat att aca aga			2308
Thr Val Leu Gln Ser Ile Glu Asn Tyr Val Gln Ile Asp Ile Thr Arg			
	750	755	760
gta ttt aat aat gtg ctt ctt caa caa aca caa cat tta gac agt cat			2356
Val Phe Asn Asn Val Leu Leu Gln Gln Thr Gln His Leu Asp Ser His			
	765	770	775
gga gag cca acc att aca agt cta tac aca aat tgg tat ttg gaa act			2404
Gly Glu Pro Thr Ile Thr Ser Leu Tyr Thr Asn Trp Tyr Leu Glu Thr			
780	785	790	795
ttg tta cga caa gtc agc aat ggc cat ata gca tat ttt cct gca atg			2452
Leu Leu Arg Gln Val Ser Asn Gly His Ile Ala Tyr Phe Pro Ala Met			
	800	805	810

aaa gcg ttt gtg aac tta cct aca gaa aat gaa tta aca ttc aat gca 2500

Lys Ala Phe Val Asn Leu Pro Thr Glu Asn Glu Leu Thr Phe Asn Ala

815

820

825

gag gaa tat tct gac ata tca gaa atg agg tca tta tca gaa cta cta 2548

Glu Glu Tyr Ser Asp Ile Ser Glu Met Arg Ser Leu Ser Glu Leu Leu

830

835

840

ggc cca tat ggt atg aag ttt cta agt gaa agc ctt atg tgg cat att 2596

Gly Pro Tyr Gly Met Lys Phe Leu Ser Glu Ser Leu Met Trp His Ile

845

850

855

tca tca caa gtt gct gaa ctt aag aaa ctt gtg gtg gag aat gtt gat 2644

Ser Ser Gln Val Ala Glu Leu Lys Lys Leu Val Val Glu Asn Val Asp

860

865

870

875

gtg tta aca caa atg agg acc agc ttt gac aaa cca gac cag atg gct 2692

Val Leu Thr Gln Met Arg Thr Ser Phe Asp Lys Pro Asp Gln Met Ala

880

885

890

gca ctg ttt aaa aga tta tca tct gtt gac agt gtc ttg aag agg atg 2740

Ala Leu Phe Lys Arg Leu Ser Ser Val Asp Ser Val Leu Lys Arg Met

895

900

905

aca ata att ggt gta att tta tcc ttc cga tca ttg gca caa gaa gca 2788

Thr Ile Ile Gly Val Ile Leu Ser Phe Arg Ser Leu Ala Gln Glu Ala

910

915

920

ctt aga gat gtg tta tcc tac cac att cct ttt ctt gta agt tca att 2836  
 Leu Arg Asp Val Leu Ser Tyr His Ile Pro Phe Leu Val Ser Ser Ile

925

930

935

gaa gat ttt aag gat cac att cca agg gaa act gat atg aag gtt gca 2884  
 Glu Asp Phe Lys Asp His Ile Pro Arg Glu Thr Asp Met Lys Val Ala

940

945

950

955

atg aat gtg tat gag tta tca tca gct gcc gga tta cct tgt gag att 2932  
 Met Asn Val Tyr Glu Leu Ser Ser Ala Ala Gly Leu Pro Cys Glu Ile

960

965

970

gat cct gca ttg gtc gta gct ctt tct tca caa aaa tcg gaa aac att 2980  
 Asp Pro Ala Leu Val Val Ala Leu Ser Ser Gln Lys Ser Glu Asn Ile

975

980

985

agt cca gaa gaa gag tat aaa att gcc tgc ctt ctc atg gtg ttt gtg 3028  
 Ser Pro Glu Glu Glu Tyr Lys Ile Ala Cys Leu Leu Met Val Phe Val

990

995

1000

gca gtt tct ttg cca aca ctg gcc agt aat gtg atg tct cag tac agc 3076  
 Ala Val Ser Leu Pro Thr Leu Ala Ser Asn Val Met Ser Gln Tyr Ser

1005

1010

1015

cct gct ata gaa ggg cat tgc aac aac ata cat tgc ttg gcc aaa gcc 3124  
 Pro Ala Ile Glu Gly His Cys Asn Asn Ile His Cys Leu Ala Lys Ala

1020

1025

1030

1035

atc aac cag att gct gca gct ttg ttt aca att cac aaa gga agc att 3172



Ile Asn Gln Ile Ala Ala Ala Leu Phe Thr Ile His Lys Gly Ser Ile

1040

1045

1050

gaa gac cgt ctt aaa gaa ttt ctg gcg ctt gca tcc tcc agt cta ctg 3220

Glu Asp Arg Leu Lys Glu Phe Leu Ala Leu Ala Ser Ser Ser Leu Leu

1055

1060

1065

aaa att ggc cag gag aca gat aaa act aca aca aga aat aga gaa tct 3268

Lys Ile Gly Gln Glu Thr Asp Lys Thr Thr Thr Arg Asn Arg Glu Ser

1070

1075

1080

gtt tat tta ctg cta gat atg att gta caa gaa tct cca ttc ctt aca 3316

Val Tyr Leu Leu Leu Asp Met Ile Val Gln Glu Ser Pro Phe Leu Thr

1085

1090

1095

atg gat ctt ttg gaa tct tgt ttt cct tat gtc ttg ctg aga aat gca 3364

Met Asp Leu Leu Glu Ser Cys Phe Pro Tyr Val Leu Leu Arg Asn Ala

1100

1105

1110

1115

tac cat gct gtc tac aaa caa agt gtt aca tct tct gca taaaattacc 3413

Tyr His Ala Val Tyr Lys Gln Ser Val Thr Ser Ser Ala

1120

1125

tacttaatca agataagcac gcatttttgt tgccttggtt ttacctgtag actgiggaac 3473

tattttacct taagacciga aaaagttttg tggattataa atttctttca tacggttgta 3533

ttttctgac attggtttct taatatggtt gtactacagt atacttggtt gatttaggtt 3593

gcacattcac tgaattcact gagattattc ctataatttt aaagtaicai ttatttgaaa 3653  
aacatacatt atcaacatgt ttttgatatt tgataatgaa aaaaatcitt gcttgittat 3713  
ttctgaaaaa gaactgtatt tagtgattat tttagatagt gatattatag cattcatctg 3773  
tgtgtaaatt atttcatata gggaagagtt ctgatctgta cctatggttc ttattgaaaa 3833  
caacattgga tgtgcatttc tgtgatgta tgaatacatt tctactttat ttigaaacat 3893  
ttgccaaact aaatactgta acactgtata acatttaaaa atgttaaaga actgcttagt 3953  
attagaagca gatcatttcc caaaattcta agagcagcag catagttgtt tgcttgtata 4013  
aagcctagcg ataattttta gactaacttc catggtgccc tgttggcatt agcactacca 4073  
ttgtaccctg ctgtataata aacaattcta gacattttat aactgttgat acaaattgta 4133  
gtccctaacc actttttata tatgttttaa atttttgaaa ttcaagtgtt ccttccataa 4193  
cataaaataa acactagact gtatcaaaaa aaaaaaaaaa aaa 4236

<210> 2

<211> 1128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Arg Ser Val Leu Gln Pro Ser Gln Gln Lys Leu Ala Glu Lys

1

5

10

15

Leu Thr Ile Leu Asn Asp Arg Gly Val Gly Met Leu Thr Arg Leu Tyr

20

25

30

Asn Ile Lys Lys Ala Cys Gly Asp Pro Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Leu

35

40

45

Ile Asp Lys Asn Leu Glu Ser Ala Val Lys Phe Ile Val Arg Lys Phe

50

55

60

Pro Ala Val Glu Thr Arg Asn Asn Asn Gln Gln Leu Ala Gln Leu Gln

65

70

75

80

Lys Glu Lys Ser Glu Ile Leu Lys Asn Leu Ala Leu Tyr Tyr Phe Thr

85

90

95

Phe Val Asp Val Met Glu Phe Lys Asp His Val Cys Glu Leu Leu Asn

100

105

110

Thr Ile Asp Val Cys Gln Val Phe Phe Asp Ile Thr Val Asn Phe Asp

115

120

125

Leu Thr Lys Asn Tyr Leu Asp Leu Ile Ile Thr Tyr Thr Thr Leu Met

130

135

140

Ile Leu Leu Ser Arg Ile Glu Glu Arg Lys Ala Ile Ile Gly Leu Tyr

145

150

155

160

Asn Tyr Ala His Glu Met Thr His Gly Ala Ser Asp Arg Glu Tyr Pro

165

170

175

Arg Leu Gly Gln Met Ile Val Asp Tyr Glu Asn Pro Leu Lys Lys Met

180

185

190

Met Glu Glu Phe Val Pro His Ser Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu Ile

195

200

205

Ser Leu Gln Met Val Tyr Pro Arg Arg Asn Leu Ser Ala Asp Gln Trp

210

215

220

Arg Asn Ala Gln Leu Leu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Ser Thr Met Leu

225

230

235

240

Asn Pro Ala Gln Ser Asp Thr Met Pro Cys Glu Tyr Leu Ser Leu Asp

245

250

255

Ala Met Glu Lys Trp Ile Ile Phe Gly Phe Ile Leu Cys His Gly Ile

260

265

270

Leu Asn Thr Asp Ala Thr Ala Leu Asn Leu Trp Lys Leu Ala Leu Gln

275

280

285

Ser Ser Ser Cys Leu Ser Leu Phe Arg Asp Glu Val Phe His Ile His

290

295

300

Lys Ala Ala Glu Asp Leu Phe Val Asn Ile Arg Gly Tyr Asn Lys Arg

305                      310                      315                      320  
Ile Asn Asp Ile Arg Glu Cys Lys Glu Ala Ala Val Ser His Ala Gly  
                         325                      330                      335  
Ser Met His Arg Glu Arg Arg Lys Phe Leu Arg Ser Ala Leu Lys Glu  
                         340                      345                      350  
Leu Ala Thr Val Leu Ser Asp Gln Pro Gly Leu Leu Gly Pro Lys Ala  
                         355                      360                      365  
Leu Phe Val Phe Met Ala Leu Ser Phe Ala Arg Asp Glu Ile Ile Trp  
                         370                      375                      380  
Leu Leu Arg His Ala Asp Asn Met Pro Lys Lys Ser Ala Asp Asp Phe  
385                      390                      395                      400  
Ile Asp Lys His Ile Ala Glu Leu Ile Phe Tyr Met Glu Glu Leu Arg  
                         405                      410                      415  
Ala His Val Arg Lys Tyr Gly Pro Val Met Gln Arg Tyr Tyr Val Gln  
                         420                      425                      430  
Tyr Leu Ser Gly Phe Asp Ala Val Val Leu Asn Glu Leu Val Gln Asn  
                         435                      440                      445  
Leu Ser Val Cys Pro Glu Asp Glu Ser Ile Ile Met Ser Ser Phe Val  
                         450                      455                      460

Asn Thr Met Thr Ser Leu Ser Val Lys Gln Val Glu Asp Gly Glu Val  
465 470 475 480

Phe Asp Phe Arg Gly Met Arg Leu Asp Trp Phe Arg Leu Gln Ala Tyr  
485 490 495

Thr Ser Val Ser Lys Ala Ser Leu Gly Leu Ala Asp His Arg Glu Leu  
500 505 510

Gly Lys Met Met Asn Thr Ile Ile Phe His Thr Lys Met Val Asp Ser  
515 520 525

Leu Val Glu Met Leu Val Glu Thr Ser Asp Leu Ser Ile Phe Cys Phe  
530 535 540

Tyr Ser Arg Ala Phe Glu Lys Met Phe Gln Gln Cys Leu Glu Leu Pro  
545 550 555 560

Ser Gln Ser Arg Tyr Ser Ile Ala Phe Pro Leu Leu Cys Thr His Phe  
565 570 575

Met Ser Cys Thr His Glu Leu Cys Pro Glu Glu Arg His His Ile Gly  
580 585 590

Asp Arg Ser Leu Ser Leu Cys Asn Met Phe Leu Asp Glu Met Ala Lys  
595 600 605

Gln Ala Arg Asn Leu Ile Thr Asp Ile Cys Thr Glu Gln Cys Thr Leu  
610 615 620

Ser Asp Gln Leu Leu Pro Lys His Cys Ala Lys Thr Ile Ser Gln Ala  
625 630 635 640

Val Asn Lys Lys Ser Lys Lys Gln Thr Gly Lys Lys Gly Glu Pro Glu  
645 650 655

Arg Glu Lys Pro Gly Val Glu Ser Met Arg Lys Asn Arg Leu Val Val  
660 665 670

Thr Asn Leu Asp Lys Leu His Thr Ala Leu Ser Glu Leu Cys Phe Ser  
675 680 685

Ile Asn Tyr Val Pro Asn Met Val Val Trp Glu His Thr Phe Thr Pro  
690 695 700

Arg Glu Tyr Leu Thr Ser His Leu Glu Ile Arg Phe Thr Lys Ser Ile  
705 710 715 720

Val Gly Met Thr Met Tyr Asn Gln Ala Thr Gln Glu Ile Ala Lys Pro  
725 730 735

Ser Glu Leu Leu Thr Ser Val Arg Ala Tyr Met Thr Val Leu Gln Ser  
740 745 750

Ile Glu Asn Tyr Val Gln Ile Asp Ile Thr Arg Val Phe Asn Asn Val  
755 760 765

Leu Leu Gln Gln Thr Gln His Leu Asp Ser His Gly Glu Pro Thr Ile

770                      775                      780  
Thr Ser Leu Tyr Thr Asn Trp Tyr Leu Glu Thr Leu Leu Arg Gln Val  
785                      790                      795                      800  
Ser Asn Gly His Ile Ala Tyr Phe Pro Ala Met Lys Ala Phe Val Asn  
805                      810                      815  
Leu Pro Thr Glu Asn Glu Leu Thr Phe Asn Ala Glu Glu Tyr Ser Asp  
820                      825                      830  
Ile Ser Glu Met Arg Ser Leu Ser Glu Leu Leu Gly Pro Tyr Gly Met  
835                      840                      845  
Lys Phe Leu Ser Glu Ser Leu Met Trp His Ile Ser Ser Gln Val Ala  
850                      855                      860  
Glu Leu Lys Lys Leu Val Val Glu Asn Val Asp Val Leu Thr Gln Met  
865                      870                      875                      880  
Arg Thr Ser Phe Asp Lys Pro Asp Gln Met Ala Ala Leu Phe Lys Arg  
885                      890                      895  
Leu Ser Ser Val Asp Ser Val Leu Lys Arg Met Thr Ile Ile Gly Val  
900                      905                      910  
Ile Leu Ser Phe Arg Ser Leu Ala Gln Glu Ala Leu Arg Asp Val Leu  
915                      920                      925



Ser Tyr His Ile Pro Phe Leu Val Ser Ser Ile Glu Asp Phe Lys Asp  
930 935 940

His Ile Pro Arg Glu Thr Asp Met Lys Val Ala Met Asn Val Tyr Glu  
945 950 955 960

Leu Ser Ser Ala Ala Gly Leu Pro Cys Glu Ile Asp Pro Ala Leu Val  
965 970 975

Val Ala Leu Ser Ser Gln Lys Ser Glu Asn Ile Ser Pro Glu Glu Glu  
980 985 990

Tyr Lys Ile Ala Cys Leu Leu Met Val Phe Val Ala Val Ser Leu Pro  
995 1000 1005

Thr Leu Ala Ser Asn Val Met Ser Gln Tyr Ser Pro Ala Ile Glu Gly  
1010 1015 1020

His Cys Asn Asn Ile His Cys Leu Ala Lys Ala Ile Asn Gln Ile Ala  
1025 1030 1035 1040

Ala Ala Leu Phe Thr Ile His Lys Gly Ser Ile Glu Asp Arg Leu Lys  
1045 1050 1055

Glu Phe Leu Ala Leu Ala Ser Ser Ser Leu Leu Lys Ile Gly Gln Glu  
1060 1065 1070

Thr Asp Lys Thr Thr Thr Arg Asn Arg Glu Ser Val Tyr Leu Leu Leu  
1075 1080 1085

Asp Met Ile Val Gln Glu Ser Pro Phe Leu Thr Met Asp Leu Leu Glu

1090

1095

1100

Ser Cys Phe Pro Tyr Val Leu Leu Arg Asn Ala Tyr His Ala Val Tyr

1105

1110

1115

1120

Lys Gln Ser Val Thr Ser Ser Ala

1125

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 265

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

cagcagcagc agcagcatat gttgttgctt gtataaagcc tagcgataat ttttagacta 60

acttccatgg tgccctgttg gcattagcac taccattgta ccctgctgta taataaaca 120

tccttagacat ttatcaactg ttgatacaaa tgttagtccc taaccacgtt ttatatatgt 180

tttaaatttt tgaaattcaa gtgtaccitc cataacataa aataaacact agactgtatc 240

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

265

&lt;210&gt; 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

tttttttttt tttttttttt ttttg

25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

tttttttttt tttttttttt tttta

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

tttttttttt tttttttttt ttttc

25

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

cagcagcagc agcag

15

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

ctgctgctgc lgctg

15

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 9

cgcaattaac cctcactaaa g

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

gcgtaatacg actcactata g

21

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

ccaggtaggcg gacgtgtg

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

ctcctgccaa gagctcat

18

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

tgctgctctc ctcgacatg

19

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 14

gtcattcctc caaggtcagc

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 15

cagtattcta ggtagtgccc

20

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 16

agcagtgtccc tgaagatta

19

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 17

gcttgtataa agcctagcg

19

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA



<400> 18

ggaaggtaca ctigaatttc

20

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 19

agaaggctgc tggagctgg

19

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 20

cigtgacaaa tttttggtca ag

22

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 21

tgcttgtata aagcctagcg

20

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

catgggccct taaatccata acatc

25

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

cattggatgt gcattctgtg

20

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 24

gatgttatgg atttaaggg

19

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 25

cttgcgtctt tctctgtgc

19

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 26

agcactgagc gcgacatggt

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 27

accatgtcgc gctcagtgct

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA